

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO



**MIGRAÑA Y FUNCIÓN ENDOTELIAL: RELACIÓN EN EL
PERÍODO CRÍTICO E INTERCRÍTICO**

TESIS DOCTORAL

XIANA RODRÍGUEZ OSORIO

2010

El **Prof. Dr. José Castillo Sánchez**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, Coordinador del Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas y Coordinador del Área de Neurociencias del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y el **Dr. Rogelio Leira Muiño**, Médico Adjunto del Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela CERTIFICAN que Dña. Xiana Rodríguez Osorio ha realizado bajo su dirección el trabajo “Migraña y función endotelial: relación en el periodo crítico e intercrítico” y se encuentra en condiciones para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela para optar al grado de Doctor.

Santiago de Compostela, junio de 2010

Fdo. Dr. Rogelio Leira Muiño

Fdo. Prof. Dr. José Castillo Sánchez

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC: adenilato-ciclasa

ACM: arteria cerebral media

ADMA: dimetil arginina asimétrica, del inglés *Asymmetric Dimethyl-Arginine*

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

AIT: ataque isquémico transitorio

AM: adrenomodulina

AMP_c: adenosín monofosfato cíclico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*

b-FGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico, del inglés *Basic-Fibroblasts Growth Factor*

BHE: barrera hematoencefálica

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

CAM: molécula de adhesión celular, del inglés *Cell Adhesion Molecule*

CEC: célula endotelial circulante

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

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

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

cNOS: sintasa del óxido nítrico constitutiva, del inglés *Constitutive Nitric Oxide Synthase*

CPC: célula progenitora circulante, del inglés *Circulating Progenitor Cell*

DCP: depresión cortical propagada

DE: disfunción endotelial

DM: diabetes mellitus

ECA: enzima convertidora de la angiotensina

EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio, del inglés *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*

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

EDTA K3: etilendiaminotetraacético sal tripotásica

EGF: factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermic Growth Factor*

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

eNOS: enzima endotelial sintasa del óxido nítrico, del inglés *Endothelial Nitric Oxide Synthase*

EPC: célula progenitora endotelial, del inglés *Endothelial Progenitor Cell*

ET: endotelina

FGF: factor de crecimiento fibroblástico, del inglés *Fibroblastic Growth Factor*

FMD: dilatación mediada por flujo, del inglés *Flow-Mediated Dilatation*

FvW: factor de von Willebrand

GC: guanilato-ciclasa

GMPC: guanosina monofosfato cíclico

GPCR: proteína G acoplada al receptor, del inglés, *G-Protein-Coupled Receptor*

HIF: factor inducible de hipoxia, del inglés *Hipoxic Inducible Factor*

HLA: antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leucocyte Antigen*

HPLC: análisis de alto rendimiento de cromatografía líquida, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*

HSC: células madre hematopoyéticas, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*

HTA: hipertensión arterial

IAPP: amilina, del inglés *Islet Amyloid Polypeptide*

ICAM: molécula de adhesión intercelular, del inglés *Intercellular Adhesion Molecule*

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina

IGF: factor de crecimiento insulínico, del inglés *Insulin Growth Factor*

IHS: del inglés, *International Headache Society*

IMT: índice íntima-media, del inglés *Intima-Media Thickening*

INF: interferón

IP: inositol fosfato

KDa: kilodaltons

KGF: factor de crecimiento derivado de queratinocitos, del inglés *Keratinocyte Growth Factor*

LDL: lipoproteínas de baja densidad, del inglés, *Low Density Lipoproteins*

LFA-1: antígeno asociado a la función linfocitaria, del inglés, *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*

L-NAME: N^G-nitro-L-arginina-metil-éster

L-NMMA: N^G-monometil-L-arginina

L-NNA: N^G-nitro-L-arginina

MA: migraña con aura

MAC: molécula de adhesión celular

MAC-1: antígeno macrofágico 1 del inglés, *Macrophage-1 Antigen*

MEG: magnetoencefalografía

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

MSA: migraña sin aura

MTHFR: metilén-tetra-hidrofolato reductasa

NA: noradrenalina

NF-kB: factor nuclear kappa B, del inglés *Nuclear Factor-kappa B*

NKA: neuroquinina A

NO: óxido nítrico, del inglés *Nitric Oxide*

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

NO_x: metabolitos estables del óxido nítrico

NPY: neuropéptido Y

NT: neurotransmisor

OMS: organización mundial de la salud

PACAP: péptido activador de la adenilato-ciclase pituitaria, del inglés *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide*

PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1, del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor-1*

PCR: proteína C reactiva

PCR-US: proteína C reactiva ultrasensible

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas, del inglés *Platelet Derived Growth Factor*

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

PGI₂: prostaciclina

PIGF: factor de crecimiento placentario, del inglés *Placental Growth Factor*

PIP: fosfoinositol-fosfato

PLC: fosfolipasa C

RAMP: proteína modificadora de la actividad del receptor, del inglés *Receptor Activity-Modifying Protein*

ROS: especies reactivas del oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*

RTK: receptor tirosinaquinasa

SP: sustancia P

SPECT: tomografía computerizada por emisión de positrones, del inglés *Single Photon Emission Computed Tomography*

STV: sistema trigémino-vascular

TA: tensión arterial

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

TAS: tensión arterial sistólica

TBAR: sustancia reactiva al ácido barbitúrico, del inglés *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*

TGF: factor de crecimiento transformante, del inglés *Transforming Growth Factor*

TM: trombomodulina

t-PA: activador tisular del plasminógeno, del inglés *Tisular-Plasminogen Activator*

TRPV-1:receptor de potencial transitorio V1, del inglés *Transient Receptor Potential cation channel,subfamily V, member 1*

VDE: vasodilatación dependiente de endotelio

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGF-R: receptor para el VEGF, del inglés *VEGF-Receptor*

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

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés *Very Low Density Lipoproteins*

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

VSMC: células musculares lisas vasculares, del inglés *Vascular Smooth Muscle Cells*

5-HT: 5-hidroxi-triptamina o serotonina

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	5
1.1. MIGRAÑA.....	7
1.1.1. CONCEPTO, EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO	7
1.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA	12
1.1.2.1. TEORÍAS CLÁSICAS	12
1.1.2.2. PRÓDROMOS.....	17
1.1.2.3. AURA.....	18
1.1.2.4. CEFALEA.....	22
1.1.2.5. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	29
1.2. ENDOTELIO	45
1.2.1 RECUERDO ANATÓMICO	45
1.2.2. FISIOLÓGÍA DEL ENDOTELIO.....	48
1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	58
1.3.1. CONCEPTO	58
1.3.2. MECANISMOS PATOGÉNICOS	60
1.3.3. MÉTODOS DE VALORACIÓN	63
1.3.3.1. MÉTODOS ULTRASONOGRÁFICOS	64
1.3.3.2. MARCADORES MOLECULARES	84
1.3.3.3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES	100
2. JUSTIFICACIÓN.....	113
3. HIPÓTESIS	117

4. OBJETIVOS	121
4.1. OBJETIVO PRINCIPAL	121
4.2. OBJETIVO SECUNDARIO.....	121
5. PACIENTES Y MÉTODOS.....	125
5.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES	125
5.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	125
5.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	126
5.2. DESCRIPCIÓN DE PARAMETROS	128
5.2.1. VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS	128
5.2.2. VARIABLES CLÍNICAS.....	128
5.2.3. VARIABLES ULTRASONOGRÁFICAS	131
5.2.4. VARIABLES MOLECULARES	135
5.2.5. DETERMINACION DE CELULAS ENDOTELIALES.....	139
5.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	141
5.4. GRUPO CONTROL	142
5.5. MÉTODO ESTADÍSTICO	142
6. RESULTADOS.....	147
6.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO	147
6.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLOGICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO	147
6.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO.....	148
6.2. ESTUDIO ANALÍTICO	153

6.2.1. SUJETOS CONTROL Y PACIENTES CON MIGRAÑA EN EL PERÍODO INTERCRÍTICO	153
6.2.2. PACIENTES CON MIGRAÑA EN EL PERÍODO INTERCRÍTICO Y PACIENTES DURANTE LA CRISIS DE MIGRAÑA.....	159
6.2.3. MIGRAÑAS SIN AURA Y MIGRAÑAS CON AURA	165
6.2.4. RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y LAS VARIABLES CLÍNICAS DE LA MIGRAÑA.....	168
6.2.4.1. RELACIÓN CON EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA MIGRAÑA.....	168
6.2.4.2. RELACIÓN CON LA FRECUENCIA DE CRISIS.....	170
6.2.4.3. RELACIÓN CON LA INTENSIDAD DEL DOLOR	174
6.2.4.4. RELACIÓN CON LA DURACIÓN DE LAS CRISIS.....	177
7. DISCUSIÓN	183
8. CONCLUSIONES	201
9. BIBLIOGRAFÍA	205

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MIGRAÑA

1.1.1. CONCEPTO, EPIDEMIOLOGÍA E IMPACTO

7

La migraña, también denominada jaqueca, es un tipo de cefalea primaria episódica que se define por sus características clínicas: son episodios recurrentes de cefalea unilateral pulsátil de elevada intensidad que se agravan con la actividad física habitual y suelen acompañarse de hipersensibilidad a la luz y al ruido y síntomas vegetativos como náuseas o vómitos¹.

Su diagnóstico es clínico y se rige por los criterios establecidos en 1988 por la *International Headache Society* (IHS) y posteriormente revisados en 2004. En dicha clasificación se distinguen dos entidades: la migraña sin aura o migraña común y la migraña con aura o migraña clásica, entendiendo el aura como el síntoma neurológico transitorio visual, sensitivo o del lenguaje que puede preceder o acompañar a la cefalea (tabla 1)²⁻³.

La migraña sin aura es la forma de migraña más frecuente y constituye el 75% de los casos de migraña. Las crisis aparecen con mayor frecuencia en las migrañas sin aura y el componente hereditario tiene un peso menor que en la migraña con aura. Hasta un 50% de los pacientes migrañosos presentan antecedentes familiares de migraña. No asocian sintomatología neurológica transitoria focal.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA MIGRAÑA SIN AURA (IHS 2004)	
	Al menos 5 ataques de migraña que cumplan los criterios B, C y D
8	Duración de los ataques de cefalea entre 4 y 72 horas (cuando no han sido tratados o el tratamiento no ha tenido éxito)
	La cefalea presenta, al menos, dos de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> • Localización unilateral • Pulsatilidad • Intensidad de dolor moderada o grave • Agravamiento con la actividad física rutinaria o condicionante para que se limite esa actividad
	Durante el dolor se asocia, al menos, uno de los siguientes síntomas: <ul style="list-style-type: none"> • Náuseas, vómitos o ambos • Fotofobia y sonofobia
	El dolor no se atribuye a otra enfermedad

Tabla 1: Criterios diagnósticos de la migraña sin aura (IHS 2004)

Lo más habitual es que en un mismo paciente se sucedan crisis de migraña sin aura y crisis de migraña con aura.

La frecuencia de los episodios de migraña es variable, desde pacientes con crisis anuales a otros sujetos con varios episodios por semana. Aproximadamente un 25% de los pacientes migrañosos sufren ≥ 4 crisis de migraña graves al mes, un 35% entre 1 y 3 ataques mensuales y el 40% restante, ≤ 1 crisis mensual. Por la propia definición de migraña, la duración de la cefalea oscila entre 4 y 72 horas, salvo que se haya tomado tratamiento durante las primeras fases del dolor. Una duración superior a 3 días correspondería a una situación de estado migrañoso. En el 65% de los casos la duración del dolor es < 48 horas⁴. La intensidad de la cefalea es moderada o grave, salvo en las fases iniciales, en las que el dolor suele ser leve.

Los síntomas acompañantes al dolor pueden ser tan limitantes o incluso más que la propia cefalea, sobretodo los gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea). Los más frecuentes son la hipersensibilidad a la luz (fotofobia), al ruido (sonofobia) o a determinados olores (osmofobia).

Las migrañas con aura suponen entre un 15 y un 30% de las consultas por migraña. Su diagnóstico añade a los criterios anteriormente mencionados la presencia de aura (síntomas de disfunción neurológica focal de origen cortical). Pueden ser síntomas visuales (hasta en el 90% de los casos), sensitivos unilaterales (hasta en el 60% de las migrañas con aura) o del lenguaje (afasias, con una frecuencia de aparición mucho más reducida) (figura 1). Generalmente se manifiestan antes de la aparición de la cefalea aunque también pueden coincidir.

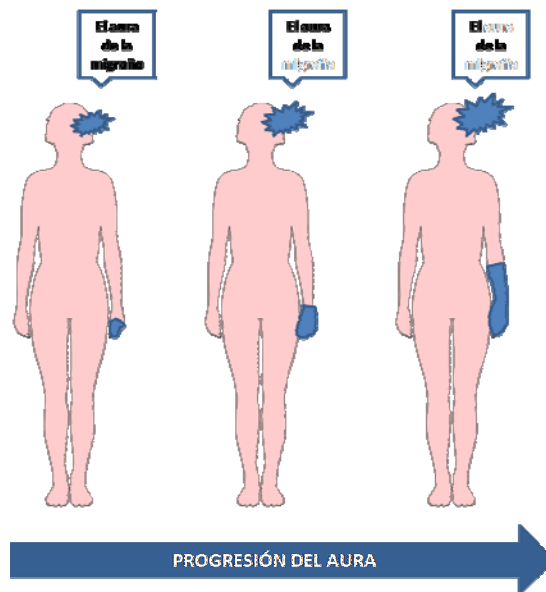


Figura 1: Síntomas del aura y progresión

Para realizar el diagnóstico de migraña con aura tienen que darse al menos dos crisis con las características definidas por la IHS 2004 para la migraña con aura (tabla 2).

Existen otras variantes menos frecuentes de la MA, como son la migraña hemipléjica familiar o esporádica (aura con hemiparesia), la migraña basilar (aura con síntomas típicos del territorio basilar sin asociar paresia) o aura migrañosa típica sin cefalea (o con cefalea de características no migrañosas)⁵.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA MIGRAÑA CON AURA (IHS 2004)
Que se hayan producido al menos dos crisis que cumplan los criterios B, C y D
Las crisis deberán ir precedidas de un aura consistente en, al menos, uno de los siguientes síntomas: <ul style="list-style-type: none"> • Síntomas visuales totalmente reversibles (fenómenos positivos como visión de líneas o de luces, o negativos como pérdida de visión) • Síntomas sensitivos totalmente reversibles (síntomas positivos como parestesias o negativos como adormecimiento) • Trastorno del lenguaje totalmente reversible
Presencia de, al menos, dos de las siguientes condiciones: <ul style="list-style-type: none"> • Síntomas visuales homónimos y/o síntomas visuales unilaterales • Desarrollo de uno de los síntomas del aura de forma gradual, en más de 5 minutos, o desarrollo de los diferentes síntomas del aura en sucesión, durante más de 5 minutos • Duración de cada síntoma entre 5 y 60 minutos
Presencia de una cefalea que cumpla criterios de migraña y que comience durante el aura o en un máximo de 60 minutos después de haber finalizado el aura

Tabla 2: Criterios diagnósticos de la migraña con aura (IHS 2004)

La migraña aún constituye, hoy en día, una de las enfermedades neurológicas más infradiagnosticadas y menos tratadas⁶. Es el motivo más frecuente de consulta en neurología, no sólo por su elevada prevalencia sino también por afectar negativamente a la calidad de vida de quienes la presentan⁷.

A pesar de que es una patología que, en la mayoría de los casos, no conlleva un incremento de mortalidad ni de secuelas físicas entre los pacientes que la sufren, en la actualidad se reconoce que las crisis de migraña repercuten de forma sustancial en la calidad de vida de los pacientes. Representa una patología con costes personales (individuales, familiares y sociales) y económicos considerables, derivados de los cuidados médicos que requieren los propios pacientes y de la disminución de la productividad del sujeto en el ámbito laboral, debido a su recurrencia de manera no previsible⁸. La migraña es el trastorno neurológico más costoso en la Unión Europea (27.000 millones de euros anuales que incluyen la productividad anual perdida y los costes directos estimados)². El dolor de cabeza puede obligar a reducir la actividad habitual hasta en un 50% de los casos y llega a requerir reposo en cama hasta en un 30% de ellos. Por todo ello, la OMS le ha otorgado el máximo grado de incapacidad⁹.

En el mundo occidental la prevalencia anual global de la migraña es del 11% (18% en mujeres y del 6% en varones), con picos de prevalencia (25% en mujeres) en los años más productivos de la edad adulta (de los 25

a los 55 años)¹⁰⁻¹¹. Por ello supone una importante carga económica tanto para el enfermo como para la sociedad, ya que afecta fundamentalmente a adultos jóvenes en edad laboral.

Su incidencia no depende ni del área geográfica ni de diferencias raciales, sino que es más sensible a factores culturales. El pico de máxima incidencia se sitúa entre los 15 y los 30 años de edad, y es mínimo a partir de los 50 años. Hasta un 20% comienzan en la edad infantil.

Considerando que tanto el diagnóstico de migraña como el establecimiento de un tratamiento efectivo son procedimientos de bajo coste, reducir el tiempo entre el inicio de la clínica y el diagnóstico podría aliviar parte de los gastos directos e indirectos que condiciona esta patología¹².

1.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

1.1.2.1. TEORÍAS CLÁSICAS

Se han descrito clásicamente dos teorías acerca de la patogénesis de la migraña: la teoría vasogénica y la teoría neurogénica.

Thomas Willis en 1660 escribió la primera monografía moderna sobre esta enfermedad y reseñó la importancia de los factores vasculares en la génesis de la migraña¹³. A principios del siglo XX, Wolff proponía una

teoría vasogénica en la que el fenómeno del aura se debía a una vasoconstricción transitoria de las arterias intracraneales y el dolor aparecía por una vasodilatación “de rebote” secundaria, que tenía lugar en los vasos cerebrales y meníngeos¹⁴.

Las auras sucederían como consecuencia de la hipoperfusión secundaria a la vasoconstricción de los vasos sanguíneos que irrigan a la corteza y, según su localización en los distintos lóbulos cerebrales, se explicaría la sintomatología de este fenómeno. La vasodilatación reactiva sería la responsable de la aparición del dolor, por estimulación de las fibras nerviosas sensitivas perivasculares. Esta teoría podría dar respuesta a la calidad pulsátil del dolor, su localización variada y el alivio que se produce tras la ingesta de agentes vasoconstrictores como la ergotamina o los triptanes¹⁵. También se postuló que la apertura de uniones arteriovenosas durales podría provocar el robo de la sangre de los capilares sanguíneos y tendría lugar un ataque de migraña.

La teoría neurogénica se basa en el concepto de depresión cortical propagada propuesto por Leao¹⁶. Sostiene que las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral se desarrollan como consecuencia de acontecimientos neuronales. Aproximadamente el 10% de los pacientes con migraña con aura presenta un aura más elaborada y de progresión más lenta que la duración habitual, como sucede en el fenómeno de los espectros de fortificación¹⁷. Lashley (un neuropsicólogo que padecía migrañas con aura) consideró, en 1941, la posibilidad de que la migraña se desencadenara

como consecuencia de ondas de excitación que se propagaban a lo largo del córtex visual y calculó la velocidad de avance del escotoma, infiriendo la velocidad del daño del córtex visual (3 mm/min)¹⁸. En 1944 fue Leao quien observó este fenómeno en animales de experimentación y lo denominó “depresión propagada”, postulando que constituía el fundamento del aura migrañosa (figura 2)¹⁹. Este fenómeno justificaría el origen neurógeno de la migraña en el córtex cerebral.

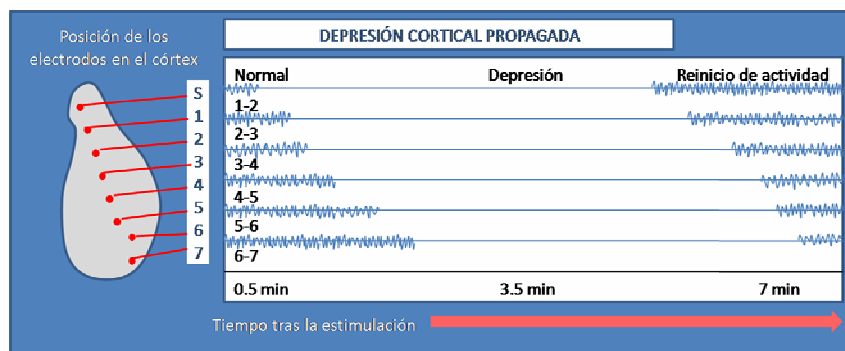


Figura 2: Depresión cortical propagada

Durante un ataque de migraña se produce una fase de hiperperfusión de breve duración seguida de otra relativamente prolongada de hipoperfusión (con una reducción del flujo sanguíneo cerebral regional del 20-30%) que se corresponde con la DCP. Es el reflejo de una onda de despolarización neuronal y glial que continúa con una supresión de la actividad neuronal, de mayor duración.

Estudios de imágenes mediante el empleo de técnicas dependientes del nivel de oxigenación sanguínea (BOLD) y estudios de imágenes de perfusión durante los ataques de migraña con aura han evidenciado cambios en estas señales, característicos de la DCP dentro del cerebro humano²⁰. Estas investigaciones revelaron que existía una vasodilatación inicial al inicio del aura visual que progresaba a lo largo del córtex occipital a una velocidad de 3.5 ± 1.1 mm/min. Esta vasodilatación se seguía de una hipoperfusión.

El hecho de que cambios electrofisiológicos como los que suceden durante la DCP son los que originen el aura de la migraña se apoya en que los cambios de señal que dependen de los niveles de oxígeno se interrumpen durante el aura en los surcos mayores del cerebro, se suprimen las respuestas visuales evocadas por estímulos luminosos durante el aura o porque las áreas afectadas al principio también son las primeras en recuperarse.

Esta teoría neurogénica sólo serviría para explicar fenómenos subyacentes a la migraña con aura ya que en la migraña sin aura no se han demostrado alteraciones del flujo sanguíneo cerebral regional.

Debido a que los mecanismos anteriores considerados de manera separada no sirven para justificar todos los fenómenos que suceden en una crisis de migraña, surgen los primeros intentos de unificar ambas teorías. Se sugiere entonces que la migraña tendría como desencadenante

inicial un fenómeno de origen neuronal, aunque el dolor secundario de características migrañosas tendría su origen en los vasos sanguíneos extracerebrales, preferentemente meníngeos.

Por lo tanto, en una crisis de migraña con aura tendría lugar un hipometabolismo acompañado de una hipoperfusión en el hemisferio ipsilateral al dolor que se iniciaría en sus regiones más posteriores. La influencia de determinados factores externos podría condicionar una activación de determinados núcleos del tronco cerebral (*locus coeruleus*, núcleos del rafe) que constituirían el lugar de origen de la inervación serotoninérgica encefálica, y esto provocaría la activación de las terminaciones sensitivas vasculares trigeminales. En dichas terminaciones se liberarían determinados neuropéptidos vasoactivos (sustancia P, CGRP), que darían lugar a la denominada inflamación neurogénica (figura 3).

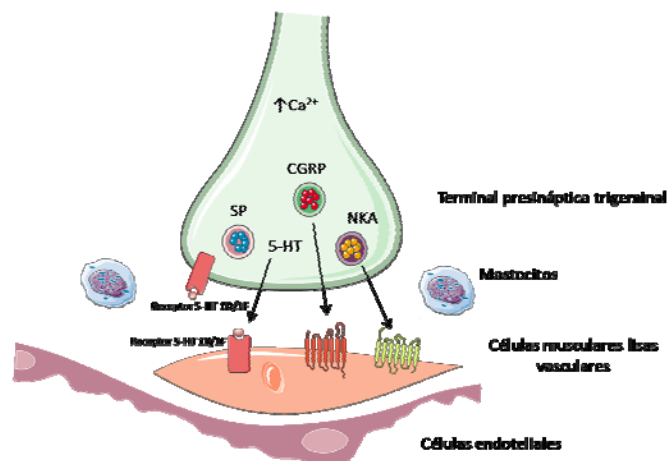


Figura 3: Inflamación neurogénica estéril

Se induciría así una vasodilatación y posterior extravasación de proteínas plasmáticas, que coincidiría con el inicio del dolor de características pulsátiles. Es lo que se conoce como activación retrógrada del sistema trigéminovascular. Estas fibras trigeminales activadas de forma patológica transmitirían información nociceptiva a centros superiores para que el dolor se hiciera consciente y también a otros centros (como el centro del vómito) que contribuirían al desarrollo de resto de síntomas acompañantes (activación anterógrada)²¹.

Los mecanismos implicados en la fisiopatología de la migraña deberían ser capaces de explicar las diferentes fases de la migraña: los pródromos, el aura y la cefalea.

1.1.2.2. PRÓDROMOS

Existe una fase prodrómica en la que se ha postulado la existencia de anomalías genéticas que altere el umbral de respuesta a los desencadenantes de la migraña en el cerebro¹. Por las manifestaciones clínicas que suceden durante esta fase (bostezos, cambios de humor, retención hídrica, avidez por los dulces) se propuso un origen en regiones límbicas e hipotalámicas. En la actualidad se cree que el núcleo supraquiasmático podría actuar de marcapaso sobre los núcleos del tronco cerebral, sin que se haya podido demostrar²². También es posible que los pródromos sean el resultado de una actividad cortical difusa conjuntamente con una alteración funcional del hipotálamo²³.

1.1.2.3. AURA

18

El 15-30% de los pacientes con migraña experimentan los síntomas del aura y la duración oscila entre 5-60 minutos de forma previa al inicio del dolor²⁴.

La depresión cortical propagada es una onda de intensa y transitoria actividad eléctrica que se propaga a lo largo del córtex a una velocidad de 2-6 mm/min y que podría llevar a una supresión neuronal de mayor duración²⁵.

Pocos años después del conocimiento del fenómeno de depresión cortical propagada se estableció una conexión entre este fenómeno y el aura de la migraña²⁶. La disminución en el flujo cerebral que sucede durante la DPC, aunque suele iniciarse en el lóbulo occipital, puede involucrar a todo el hemisferio²⁷.

Se considera que la migraña con aura se debe a una disfunción neuronal, en lugar de ser secundaria a fenómenos isquémicos, y probablemente es la manifestación clínica de la DCP²⁸. Esta área de hipoperfusión no presenta una distribución que sugiera una afectación cerebral vascular²⁹. Estudios mediante PET han mostrado cómo existe una reducción en el flujo sanguíneo cerebral, que progresa a lo largo de la corteza en seres humanos y que podría relacionarse con la DCP³⁰. Otros estudios que emplearon RM funcional han mostrado la existencia de

cambios vasculares (hiperemia inicial seguida de hipoperfusión moderada) durante los fenómenos del aura³¹. Además, la recuperación tanto de las manifestaciones clínicas del aura como de los cambios neurovasculares, se inician en las regiones del córtex donde se había iniciado la despolarización³². Estudios realizados mediante técnicas de RM de perfusión constatan que, durante el aura, el flujo sanguíneo se mantiene por encima del umbral de isquemia²⁰. Otras investigaciones que emplearon MEG apoyan la existencia de cambios neuroeléctricos durante el aura de los pacientes con migraña³³.

El mecanismo que subyace a la DCP sería el siguiente: tras un estímulo irritante local (estímulo mecánico o eléctrico, aplicación de potasio, glutamato) se provoca una despolarización, con la consiguiente entrada de Na^+ , Ca^{2+} , agua y Cl^- al interior de las neuronas y de las células gliales, y la salida de K^+ y H^+ al espacio extracelular. Esta despolarización provoca la liberación de aminoácidos excitadores³⁴⁻³⁵. La acción de estos aminoácidos (glutamato y aspartato, que ya han demostrado su capacidad para inducir DCP en animales de experimentación) y el propio K^+ serían los responsables de la propagación del fenómeno, conjuntamente con niveles disminuidos de magnesio intracerebral³⁶⁻³⁷. Los astrocitos son los principales responsables del mantenimiento del equilibrio iónico en el córtex cerebral, regulando las entradas y salidas de calcio y potasio de las células³⁸. La corteza visual primaria es la región del córtex donde existe una mayor proporción de neuronas respecto a células gliales y esta

circunstancia podría ayudar a explicar por qué este fenómeno se da con mayor frecuencia de forma espontánea en esta región del cerebro.

Además, durante los fenómenos de DCP se incrementan las concentraciones locales de NO (la entrada de Ca^{2+} al interior celular activa a la nNOS y se estimula la producción de NO)³⁹. La producción de NO podría suponer, a su vez, una retroalimentación negativa sobre los procesos que han generado la DCP⁴⁰. Se ha constatado que el empleo de inhibidores de NOS retrasa el inicio de la repolarización tras la inducción de DCP en experimentación animal⁴⁰⁻⁴¹.

Parecería lógico pensar que, en los pacientes que padecen migraña sin aura, pudiera existir una DCP sin correlación clínica, pero que pusiese en marcha los mecanismos del dolor a través de la inducción de la vasodilatación e inflamación neurogénica promovida por el NO⁴². No obstante, no hay estudios de neuroimagen que hayan podido constatar cambios vasculares corticales en los pacientes con MSA³⁰. Además, el tonabersat (un fármaco que no reduce las crisis de dolor pero evita el aura de la migraña, ha resultado ineficaz en la migraña sin aura)⁴³. Es por ello por lo que otros autores se decantan por la posibilidad de que la DCP no sea un fenómeno necesario para la ocurrencia de la migraña y que habría que considerarlo un epifenómeno acompañante. El mecanismo iniciador de un ataque se localizaría en los núcleos del tronco cerebral, y esta afirmación está apoyada por estudios de PET en los que se han evidenciado únicamente cambios en los núcleos del troncoencéfalo en pacientes con migraña desarrollada de forma espontánea o

desencadenada tras la administración de nitratos⁴⁴⁻⁴⁵. En los últimos años se ha comprobado que la aplicación local de ET-1 (un vasoconstrictor potente) administrado a dosis inferiores de las que provocarían una isquemia era capaz de inducir la DCP in vivo en animales de experimentación, pero no in vitro. Se postula un mecanismo vascular subyacente como factor desencadenante, que no se había demostrado hasta ahora en la génesis del aura⁴⁶.

Los siguientes elementos apoyan la activación de los núcleos del tronco cerebral (*locus coeruleus*, núcleos del rafe) como parte del fenómeno inicial de la migraña⁴⁷. Estudios mediante PET durante crisis espontáneas de migraña han permitido demostrar la activación de estos núcleos (focos de activación contralaterales al hemisferio doloroso)⁴⁴⁻⁴⁵. Se cree que el área más sensible a determinados desencadenantes podría estar localizada en el tronco cerebral. Existen estudios de SPECT en los que se observó un incremento del flujo cerebral durante crisis de migraña en determinadas zonas de la corteza cerebral (cíngulo, corteza de asociación auditiva y visual), y en el tronco cerebral⁴⁴. Los núcleos del tronco cerebral son capaces de generar y de suprimir los síntomas de dolor de características migrañosas tanto en animales de experimentación como en humanos⁴⁴. La activación del tronco cerebral persiste incluso tras la inyección de sumatriptán, fármaco que conseguía una remisión completa de la cefalea, la fotofobia y la sonofobia, sugiriendo que es un área fundamental para el desencadenamiento de la migraña⁴⁴. Los núcleos del rafe y el *locus coeruleus* son el principal origen de la inervación

serotoninérgica y adrenérgica, y fármacos agonistas de la serotonina (pizotifeno) o del sistema adrenérgico (β -bloqueantes) han resultado eficaces para prevenir la aparición de crisis de migraña. Asimismo se ha comprobado en animales de experimentación cómo la estimulación de estos núcleos provocaba una hipoperfusión similar a la que sucede durante el aura de la migraña⁴⁸.

1.1.2.4. CEFALEA

La cefalea es el síntoma más característico de las crisis de migraña y aparece en la mayoría de los pacientes.

El mecanismo generador podría ser el propio NO generado durante fenómenos de DCP o la activación de los núcleos del tronco cerebral, ya que ambos mecanismos podrían desencadenar la activación del sistema trigémino-vascular.

El cerebro carece de inervación por fibras sensibles al dolor. No sucede así con las meninges y los vasos sanguíneos que contienen, que presentan abundante inervación nerviosa sensitiva dependiente de la primera rama del nervio trigémino. Estas terminaciones nerviosas sensitivas perivasculares y los núcleos trigeminales constituyen el brazo aferente del llamado sistema trigémino vascular, mientras que las fibras parasimpáticas del nervio facial forman el brazo eferente. Se han demostrado conexiones entre los núcleos del tronco cerebral y las

terminaciones nerviosas sensitivas trigeminales⁴⁹. Estas fibras sensitivas incluyen fibras A-delta y fibras C, y recogen sensaciones térmicas y estímulos químicos y mecánicos⁵⁰.

Durante una crisis de migraña se produce una estimulación antidrómica de estas fibras dando lugar a procesos de vasodilatación meníngea. Estas fibras sensitivas liberan desde las terminales presinápticas perivasculares una serie de péptidos que promueven la permeabilidad vascular (VIP, sustancia P, CGRP, NKA). Se produce, de este modo, una respuesta inflamatoria estéril dentro de la duramadre que, a su vez, provoca la sensibilización de las fibras nerviosas sensitivas a determinados estímulos que previamente resultaban inocuos (como las pulsaciones de los vasos sanguíneos o cambios en la presión venosa), y que ahora determinan un incremento de la mecanosensibilidad y una hiperalgesia (de ahí que el dolor pueda incrementarse con los movimientos cefálicos o con la tos)⁵¹. Estos procesos sensibilizan a los nociceptores periféricos y esta información nociceptiva desde los vasos cerebrales se transmite a los núcleos trigeminales y de allí se dirige al tálamo y al córtex cerebral, donde se percibe la sensación dolorosa (figura 4).

Existen, por lo tanto, dos tipos de sensibilización: la sensibilización periférica y la sensibilización central. La primera hace referencia a la necesidad de una menor despolarización para iniciar un potencial de acción por parte de las neuronas sensitivas primarias, y está mediada por las concentraciones de calcio intracelulares o determinadas moléculas

(prostaglandinas, serotonina, bradiquinina, NGF, SP, CGRP o NKA). La sensibilización central afecta a las neuronas del asta dorsal medular que corresponden con el núcleo caudal del trigémino y su manifestación clínica es la alodinia cutánea, que consiste en la producción de una respuesta dolorosa desproporcionada tras la aplicación de un estímulo (debido a que existe una disminución en el umbral doloroso).

También se estimulan los núcleos adyacentes del tronco cerebral y se inician los fenómenos disautonómicos acompañantes de la cefalea. La estimulación de los nervios trigeminales puede facilitar la liberación de CGRP y se incrementa la vasodilatación ya existente, potenciándose los impulsos dolorosos hacia el sistema nervioso central^{25, 52}.

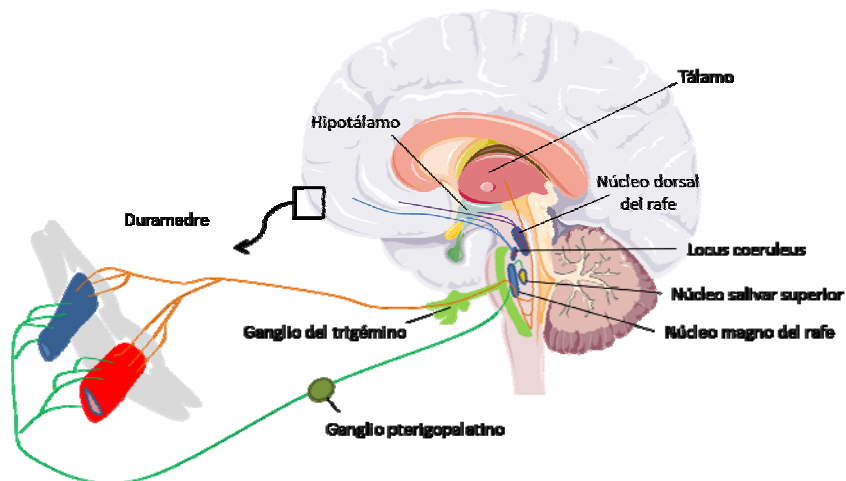


Figura 4: Las terminaciones sensitivas nerviosas liberan sustancias en el espacio sináptico que facilitan la inflamación neurogénica y envían señales a los núcleos del TC y al córtex, que provocan la sensación dolorosa

Por lo tanto, la inflamación neurogénica implica dos procesos diferentes: la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular⁵¹. Estos fenómenos se modulan, a nivel molecular, por la liberación de una serie de neuropéptidos, como son la sustancia P, la neuroquinina A, la endotelina 3 y el CGRP (figura 5).

Ambos procesos están controlados por el sistema serotoninérgico, a través de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}⁵³. El 5-HT_{1B} se localiza en los vasos meníngeos (es postsináptico) y se considera que podría regular los fenómenos de vasodilatación. El 5-HT_{1D} se localiza en la terminal presináptica de las fibras nerviosas trigeminales y sería el responsable del control de la inflamación estéril⁵⁴. Ambos constituyen la diana de acción de los fármacos agonistas serotoninérgicos (triptanes). Estos fármacos también presentan afinidad para el receptor 5-HT_{1F}, localizado a nivel presináptico y postsináptico⁵⁵. Aunque se atribuye a los triptanes una acción puramente periférica debido a su limitada capacidad de paso a través de la BHE, se ha evidenciado que determinados núcleos trigeminales poseen receptores para el sumatriptán⁵⁶⁻⁵⁷. Podría suceder que durante las crisis de migraña existiese una disrupción de la BHE y, de esta forma, se explicaría la capacidad para que el fármaco actuase también a nivel central⁵⁸. Esto justificaría, además, otros efectos farmacológicos independientes del efecto sobre el dolor (acción antiemética).

Por otra parte, el endotelio de los vasos meníngeos presenta receptores para taquinina (TACR1), que se activan tanto por la sustancia P como por la neuroquinina A, y receptores para la endotelina tipo B (que se activan por la acción de la endotelina 3).

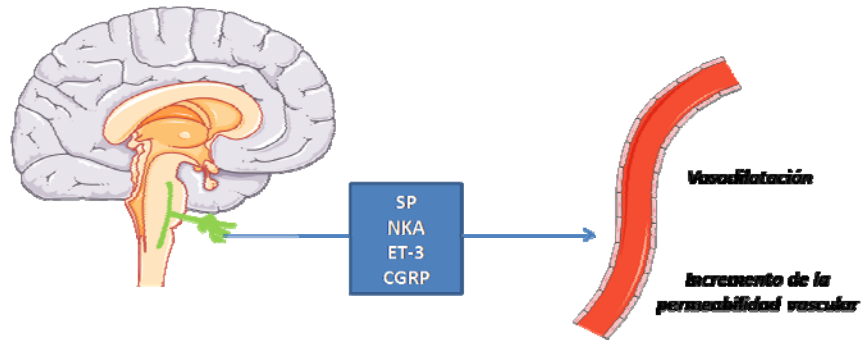


Figura 5: El sistema trigémino-vascular libera neuropéptidos que desencadenan fenómenos de vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular

La estimulación de estos receptores pondría en marcha un incremento de la permeabilidad vascular. El estímulo de los receptores TACR-1 de las células endoteliales mediante la NKA y la SP provocaría el incremento del calcio citosólico, originando una activación de los elementos contráctiles intracelulares y causando la apertura de uniones entre las propias células endoteliales. Se permitiría, de esta forma, el paso de macromoléculas al intersticio y la formación de edema inflamatorio, responsable de la extravasación de proteínas y de una inflamación aséptica perivascular y de la duramadre (figura 6)⁵⁹.

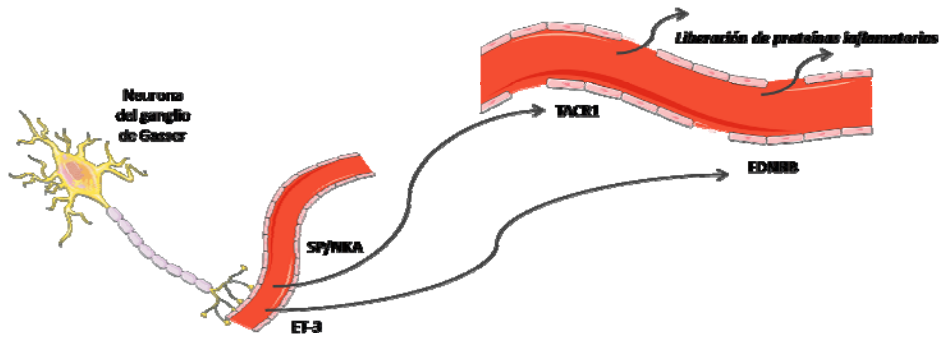


Figura 6: La NKA, la SP y la ET-3 aumentan la permeabilidad vascular y se liberan al plasma proteínas inflamatorias

La génesis de la cefalea también asocia mecanismos de vasodilatación⁵⁹⁻⁶⁰. El CGRP es un vasodilatador potente y es liberado por las neuronas del sistema trigémino-vascular conjuntamente con la sustancia P, la NKA y la ET-3. Actúa sobre un receptor específico de las células musculares lisas vasculares y su actividad induce la relajación de la fibra muscular. Este mecanismo se potencia con la actividad del óxido nítrico (figura 7).

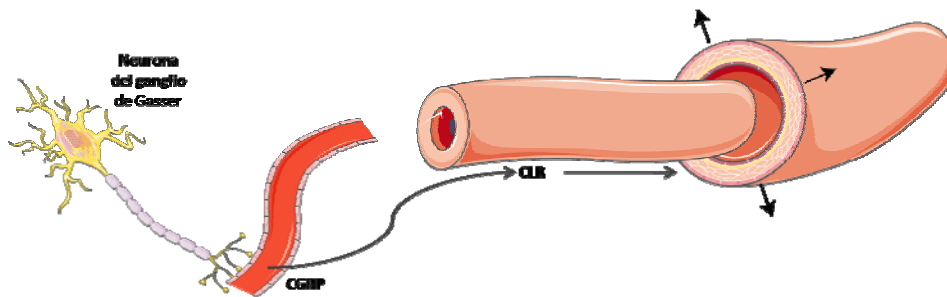


Figura 7: El CGRP estimula a receptores endoteliales desencadenando fenómenos de vasodilatación arterial

El CGRP también activa la degranulación de los mastocitos y se facilita, de este modo, la reacción inflamatoria, con la potenciación de la transmisión de impulsos nociceptivos al sistema nervioso central⁶¹. La activación del receptor de la neuroquinina facilita la adhesión leucocitaria y potencia fenómenos inflamatorios precoces, conjuntamente con la degranulación mastocítica⁶².

Los mastocitos se localizan en las regiones perivasculares, próximos a las neuronas (especialmente en la duramadre) y, por este motivo, pueden ser activados a partir de las terminaciones nerviosas trigeminales. La estimulación por diferentes sustancias (CGRP, SP, NT) puede provocar su activación y la liberación de mediadores vasoactivos y proinflamatorios, como son la IL-6 o el VEGF⁶³. La observación de que la estimulación trigeminal provoca una extravasación proteica en meninges de roedores sugiere que este mecanismo puede ser fundamental en la génesis de la migraña⁶⁴.

Hallazgos en estudios recientes, sin embargo, contradicen estas hipótesis, al evidenciar cómo agonistas de determinados péptidos vasodilatadores son capaces de desencadenar una vasodilatación cerebral sin que se correlacione con una cefalea o por el hecho de que hallazgos recientes de neuroimagen (angio-resonancia de 3Teslas) no han sido capaces de detectar cambios en el flujo cerebral tras migrañas desencadenadas por donantes de NO^{29, 65}.

1.1.2.5. MARCADORES BIOQUÍMICOS

La liberación de neuropéptidos y sustancias vasoactivas es la que provoca los fenómenos que subyacen a la migraña y que involucran al endotelio. Entre las moléculas implicadas en los fenómenos de vasodilatación e inflamación neurogénica destacan el CGRP, el VIP, la sustancia P, la NK-A o la endotelina-3. El NO, molécula fundamental para explicar el funcionamiento del endotelio, también participa en estos procesos.

Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es un neuropéptido constituido por 37 aminoácidos que pertenece a los péptidos de la familia de la calcitonina, entre los que también se incluyen la adrenomedulina y la amilina. Se descubrió en 1984⁶⁶. En humanos existen dos isoformas (α y β). Se sintetizan a partir de una transcripción alternativa del gen de la calcitonina localizado en el cromosoma 11. El ARN_m específico para el CGRP abunda en el sistema nervioso⁶⁷.

Las dos isoformas del CGRP se diferencian únicamente en 3 aminoácidos y comparten una actividad biológica y unas funciones similares⁶⁸⁻⁶⁹. La isoforma alfa es la más abundante y se encuentra tanto en el sistema nervioso central como periférico, con predominio en las

neuronas sensoriales⁶⁸. La isoforma beta predomina en el sistema autónomo y en la hipófisis^{68, 70}. En la periferia el CGRP abunda en las astas medulares dorsales. En los ganglios sensoriales el CGRP se almacena de forma conjunta con la sustancia P y en las neuronas motoras, conjuntamente con la acetilcolina⁶⁸.

Se encuentra en todas aquellas localizaciones que están implicadas en la fisiopatología de la migraña: meninges, ganglio de Gasser, núcleos trigeminales, otros núcleos del tronco cerebral o en el córtex. Los vasos sanguíneos cerebrales están inervados de forma preferente por nervios sensoriales que contienen CGRP⁷¹.

El CGRP es el péptido vasodilatador más potente del organismo y puede participar en la transmisión del dolor⁷²⁻⁷³. Se libera fundamentalmente desde las terminaciones nerviosas trigeminales. Ejerce su acción a través de un receptor heterodímero formado por una proteína G transmembrana (GPCR o *G-protein-coupled receptor*), el receptor propiamente dicho (CLR o *calcitonin receptor-like receptor*) y una proteína accesoria que modifica su actividad (RAMP1 o *receptor activity modifying protein 1*)⁷⁴⁻⁷⁵. Su vida media en el plasma, en humanos, es de 7 a 10 minutos aproximadamente⁷⁶.

La liberación del CGRP está modulada por una serie de estímulos que actúan en la terminal presináptica de las fibras nerviosas sensitivas, sobre los receptores y canales ubicados en esta localización. Se incluyen

receptores para la bradiquinina, prostanoïdes, opioides, 5-hidroxitriptamina, histamina, neuropéptido Y, somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, purinas y galanina. El más conocido entre los diferentes canales es el TRPV1 y puede activarse por niveles bajos de pH, temperaturas extremas o determinados derivados lipídicos⁷⁷. Su actividad puede modularse por la estimulación de otros receptores para la bradiquinina o prostaglandinas o el receptor tirosinaquinasa⁷⁸. Se ha observado que el etanol estimula a los receptores TRPV1 y estimula la liberación de CGRP, lo que podría fundamentar el desencadenamiento de las crisis de migraña por el alcohol debido a la activación de mecanismos neurogénicos inflamatorios⁷⁹.

Existe una interacción entre los mecanismos vasoconstrictores (regulados por acción de la noradrenalina) y vasodilatadores (mediados por el CGRP). Se ha comprobado en animales de experimentación que adrenorreceptores ubicados en las terminales sensitivas presinápticas inhiben la liberación de CGRP y que el CGRP tiene la capacidad de inhibir la liberación de NA desde los nervios simpáticos⁸⁰⁻⁸¹.

El CGRP tiene una capacidad vasodilatadora 10 veces superior a las prostaglandinas y 2-3 veces la capacidad de otros vasodilatadores clásicos como son la acetilcolina, la adenosina, la serotonina o la sustancia P⁸². La actividad vasodilatadora puede suceder por estimulación directa de las células musculares presentes en las arterias o mediante la estimulación del endotelio y la producción de óxido nítrico⁶⁸.

El CGRP estimula a los receptores CLR de las células musculares lisas. Estos activan a la adenilato-ciclasa y se incrementa la producción de AMP_c intracelular, se reduce la concentración de calcio intracelular y se produce una relajación muscular vascular⁶⁸. También puede actuar de forma indirecta estimulando a la proteinaquinasa A, que activa a canales de K⁺ dependientes de ATP⁸³. Puede actuar simultáneamente sobre los receptores CLR de las células endoteliales y, mediante la estimulación de la fosfolipasa C (PLC), se incrementa el calcio intracelular por vía del inositol trifosfato (IP3) y se estimula a la eNOS, provocando la liberación de NO⁸⁴. El NO, a su vez, activa a la guanilato-ciclasa (GC) de las células musculares lisas. Se incrementa la producción de GMP_c, disminuye el calcio intracitosólico y se produce la vasodilatación (figura 8)⁸⁵.

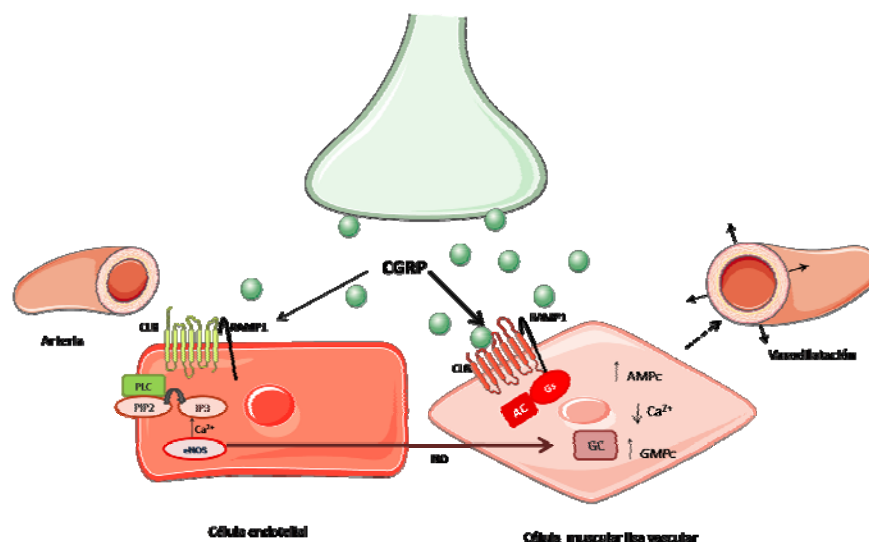


Figura 8: Vasodilatación producida por la acción preferente del CGRP sobre la célula muscular lisa vascular y de forma secundaria sobre la célula endotelial vascular

En animales de experimentación se ha visto que la relajación producida por el CGRP precisa la integridad del endotelio y esta vasodilatación podría atenuarse por la acción de inhibidores de la sintasa del óxido nítrico^{72, 86}.

El papel del CGRP, debido a su capacidad vasodilatadora y a la estimulación de la transmisión nerviosa sensitiva, se considera clave en la fisiopatología de la migraña⁷¹. La liberación de CGRP en la médula espinal dorsal se ha asociado a transmisión de estímulos nociceptivos. Su liberación desde las terminales nerviosas neurogénicas provoca una vasodilatación neurogénica⁸⁷ (figura 9). Los núcleos trigeminales y las fibras nerviosas trigeminales no mielinizadas expresan inmunorreactividad para el CGRP y las arterias intracraneales están inervadas por fibras nerviosas que almacenan diferentes neuropéptidos, de los que el más abundante es el CGRP⁸⁸.

Estudios en pacientes con migraña y sujetos controles a los que se les infundió CGRP o placebo y se midió el flujo regional cerebral por SPECT y la velocidad de flujo por doppler transcraneal de la arteria cerebral media constataron que los pacientes con migraña a los que se les infundió CGRP presentaban una disminución de la velocidad de flujo sin cambios en la cantidad de flujo, indicativo de dilatación de la ACM⁸⁹.

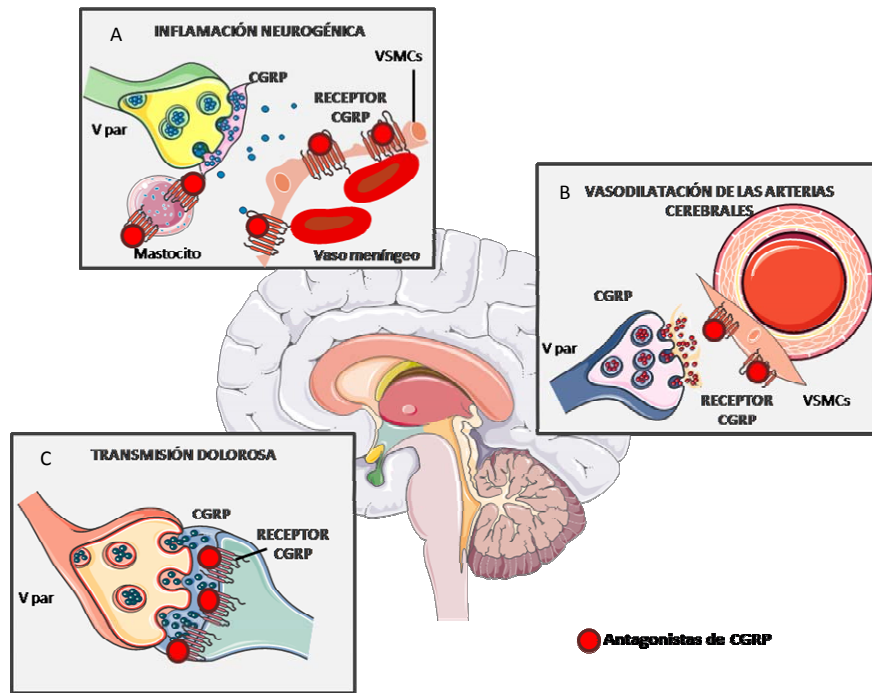


Figura 9: Funciones del CGRP. A: Papel en la inflamación neurogénica. B: Papel en la vasodilatación arterial. C: Papel en la transmisión de estímulos nociceptivos. Se ilustran las dianas de actuación de los fármacos antagonistas del CGRP.

El papel que se le atribuye en la fisiopatología de la migraña se apoya en la observación de la capacidad que la infusión intravenosa del CGRP presenta para producir cefaleas tardías de características migrañosas⁹⁰. El tratamiento con triptanes hace remitir la cefalea y reduce los niveles de CGRP. Además, la infusión intravenosa de óxido nítrico produce cefaleas de características similares a la migraña y conlleva el incremento en plasma de los niveles de CGRP, que guardan relación con la intensidad de la cefalea, según algunos estudios⁹¹. Otros trabajos no han podido constatar incrementos de CGRP tras cefaleas inducidas por NO en sujetos sanos⁹².

En pacientes con cefalea cervicogénica se midieron niveles de CGRP en vena yugular externa y vena cubital en días sin presencia y con presencia cefalea, sin encontrarse diferencias significativas⁹³. Se sugiere que el incremento del CGRP es característico de las cefaleas primarias. El CGRP también está involucrado en la dilatación arteriolar transitoria característica de la depresión cortical propagada aunque no se han constatado niveles elevados en vena yugular externa porque se cree que la DCP provoca una liberación de CGRP local que no llega a cruzar la BHE⁹⁴.

Cultivos de neuronas trigeminales muestran que el CGRP se libera desde las células ganglionares trigeminales y que su transcripción aumenta bajo condiciones que imitan a la inflamación neurogénica. Los tratamientos sintomáticos tanto pueden reducir la liberación de CGRP como inhibir su transcripción. El TNF- α , un mediador inflamatorio endógeno implicado en la génesis de la migraña, puede estimular la transcripción de CGRP.

Todos estos resultados sugieren que la activación de las terminaciones nerviosas trigeminales provoca una liberación de CGRP y otros péptidos que, a su vez, producen la liberación de mediadores proinflamatorios durante la crisis de migraña. Estos mediadores incrementan la síntesis de CGRP y su liberación durante horas-días, de forma correlativa a la habitual duración de un ataque de migraña (4-72 horas)⁹⁵.

Otros estudios en cultivos celulares observaron que, al administrar donantes de NO a cultivos de células trigeminales, se producía un incremento significativo de CGRP con respecto a cultivos celulares no estimulados con NO⁹⁶. Además de incrementarse la liberación de CGRP, aumentaba su síntesis. El sumatriptán inhibía tanto la síntesis como la liberación del CGRP por parte del NO actuando sobre los receptores 5-HT₁⁹⁷. Esta activación del CGRP por parte del NO tenía lugar a través de canales de calcio tipo T y no precisaba de un incremento del calcio intracelular. Los canales de calcio se expresan de forma abundante en las neuronas sensoriales y se cree que participan en la transmisión nociceptiva y en fenómenos de sensibilización⁹⁷. El hecho de que el NO pueda estimular la síntesis y liberación de CGRP ayuda a explicar porqué el dolor de la migraña puede persistir hasta 72 horas si no se recibe tratamiento, ya que es necesario un incremento de la síntesis y no sólo de la liberación de CGRP para mantener los niveles de CGRP elevados durante ese tiempo. La reducción de los niveles del CGRP tras la administración de sumatriptán parece estar en relación con su efecto antimigrañoso ya que, en humanos voluntarios sanos, los niveles de CGRP en la vena yugular externa no variaban tras la administración subcutánea del fármaco⁹⁸.

Se ha observado un incremento de CGRP en la vena yugular externa en modelos de migraña en experimentación animal y este incremento sólo pudo ser antagonizado mediante la administración de triptanes o de dihidroergotamina⁹⁹. La estimulación del ganglio del trigémino en animales provocó un aumento de CGRP en la vena yugular¹⁰⁰.

Otros estudios en animales de experimentación mostraron que la estimulación del seno longitudinal superior fue capaz de provocar un incremento de los niveles de CGRP en un 85% en la vena yugular externa, lo que sugiere que la activación del sistema trigémino-vascular (al estimular aferentes nociceptivos cerebrovasculares) provoca la liberación de CGRP¹⁰¹.

En estudios realizados a sujetos controles se comprobó que no existen diferencias en la liberación de CGRP dependiendo del sexo o de la edad¹⁰²⁻¹⁰³. Tampoco se encontraron diferencias en los valores de CGRP entre extracciones realizadas en la vena yugular externa y en la vena cubital¹⁰⁴.

Se han realizado determinaciones de los niveles de CGRP en pacientes migrañosos con diferentes resultados:

Hay estudios que constataron niveles significativamente más elevados de CGRP en vena cubital en pacientes migrañosos durante el período intercrítico¹⁰⁵. Postulan la existencia de una alteración permanente del control neurogénico y vascular en los pacientes con migraña. Sin embargo una publicación reciente no encontró diferencias, en las intercrisis, entre pacientes migrañosos y controles¹⁰⁶.

También se han registrado niveles más elevados de CGRP en la vena yugular externa durante un ataque migrañoso^{99, 107}. Hay estudios que

no encuentran diferencias en los niveles de CGRP entre sujetos controles y migrañas durante el período intercrítico, pero sí durante la crisis al compararlos con los niveles de los sujetos sanos¹⁰⁸. Se ha postulado una posible relación entre el incremento de las concentraciones de CGRP y la intensidad de la cefalea⁹¹. *Tvedskov y cols.* no pudieron replicar estos resultados (incremento de CGRP en la vena yugular externa durante una crisis de migraña y relación con la intensidad del dolor) y consideraron que el estudio previo (realizado por *Goadsby y cols.*) obtuvo una elevación del CGRP influida por determinados factores como el uso de opioides para el tratamiento del dolor (el estudio se realizó antes de la comercialización de los triptanes y se conoce que los opioides pueden estimular la liberación de CGRP)^{104, 107}. Estudios posteriores han mostrado, de nuevo, incrementos de CGRP durante la migraña, tanto en pacientes con MSA como MA en comparación con sujetos control¹⁰⁸.

No se han podido identificar otros neuropéptidos implicados en la fisiopatología de la migraña presentes en plasma obtenido de la vena yugular externa¹. Por otra parte existe una interrelación entre el CGRP y el NO de tal forma que los efectos vasculares del NO en parte están mediados por el CGRP liberado desde las fibras nerviosas trigeminales, mientras que la NOS coordina la liberación de CGRP conjuntamente con la producción de NO¹⁰⁹.

Se ha estudiado la respuesta a la infusión intraarterial de 5-HT (que estimula la liberación endógena de NO), nitratos (como donantes

exógenos de NO) y CGRP, y se han medido posibles cambios vasculares mediante FMD y pletismografía sin evidenciarse diferencias significativas entre migrañas y sujetos control. No hay, por tanto, cambios en la respuesta vascular periférica a NO y a CGRP en ambos grupos. Sin embargo esto no permite excluir cambios en las regiones intracraneales¹¹⁰.

El papel del CGRP no está relacionado únicamente con la cefalea sino que podría influir en la aparición de fotofobia ya que, si se inyecta CGRP a un modelo animal de ratón transgénico con sensibilidad incrementada para el CGRP (mediante la modificación del gen que codifica para la proteína RAMP1), se provoca un comportamiento de evitación de la luz que, a su vez, se bloquea al administrar antagonistas del CGRP¹¹¹.

La ergotamina y los triptanes son capaces de hacer remitir los ataques de migraña por diversos mecanismos que incluyen la vasoconstricción de las arterias intracraneales dilatadas, la reducción de la liberación de CGRP desde las terminales nerviosas trigeminales perivasculares o la inhibición de la transmisión nociceptiva^{1, 112}. Estas terminaciones trigeminales presinápticas expresan receptores de 5-HT_{1B/1D/1F}, lo que apoyaría la existencia de un efecto inhibitorio de los triptanes a nivel presináptico, reduciendo la liberación de neuropéptidos por la terminal nerviosa^{71, 113}. Debido a su unión de forma no específica a los receptores 1B y 1D, se produce una vasoconstricción que no sólo afecta al cerebro sino al resto del organismo. Esto limita el uso de triptanes y derivados ergóticos en pacientes con enfermedades cardiovasculares o

antecedentes de ictus isquémico. Se intentaron diseñar fármacos que actuasen de forma selectiva sobre los receptores 5-HT_{1D} o 5-HT_{1F}, pero no han resultado eficaces en el tratamiento de la migraña¹¹⁴⁻¹¹⁵. Como alternativa se han diseñado fármacos antagonistas de los receptores de CGRP que sí han resultado eficaces en el tratamiento de la migraña, sin efectos vasoconstrictores²⁴. No parecen afectar a la circulación cerebral o sistémica en humanos y, por lo tanto, se evita el riesgo de vasoespasmo. Actúan bloqueando la vasodilatación y evitando la vasoconstricción de las meninges y reducen la transmisión del dolor al modificar la acción del CGRP en el ganglio del trigémino. Se han estudiado el olcegepante, de forma intravenosa (BIBN 4096 BS), y el telcagepante oral (MK-0974) y ambos han resultado eficaces en el tratamiento de las crisis de dolor^{24, 116}. Sin embargo en éste último, tras administrarse por vía oral de forma continuada, se ha constatado un incremento progresivo de enzimas hepáticas¹¹⁷.

Estudios en cultivos celulares también han mostrado que el topiramato (empleado como tratamiento preventivo de la migraña) puede inhibir la liberación de CGRP desde neuronas trigeminales, y que este podría ser su mecanismo de acción para evitar la aparición de ataques de migraña¹¹⁸.

El papel del NO cada vez ha cobrado una relevancia mayor en su influencia para el desencadenamiento de las crisis de migraña, probablemente por la intensa vasodilatación que origina en las arterias

cerebrales y meníngeas¹¹⁹. También potencia la liberación de CGRP por parte de las neuronas trigeminales⁹⁷.

Otras moléculas implicadas en la fisiopatología de la migraña

Las terminaciones nerviosas liberan otra serie de moléculas vasoactivas y proinflamatorias que participan en la génesis de la migraña. Destacan el VIP, la SP, la NK-A, la endotelina-3 o el PACAP.

Las terminaciones nerviosas sensitivas son las responsables de la liberación del CGRP y de la sustancia P. Las fibras sensitivas tipo C liberan tanto CGRP como SP, mientras que las fibras sensitivas A δ contienen CGRP y glutamato de forma predominante. Se ha sugerido que exista una mayor densidad de fibras o bien una activación preferente de las fibras A δ en relación a las fibras C en los sujetos con migraña¹²⁰. El PACAP se encuentra tanto en las terminaciones sensitivas como en las parasimpáticas. El VIP se libera desde terminales nerviosas parasimpáticas.

No se ha observado el incremento en sangre venosa yugular durante una crisis de migraña para ninguna de estas sustancias (salvo el CGRP), y fármacos diseñados para antagonizar su acción no han resultado eficaces en el tratamiento de la migraña¹²¹⁻¹²².

El péptido intestinal vasoactivo es una hormona polipeptídica de la familia de la secretina producida en diferentes estructuras del organismo, con actividad parasimpática. Se sintetiza, a nivel cerebral, en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Posee una actividad vasodilatadora. Administrado a pacientes con migraña se ha comprobado que es capaz de inducir vasodilatación arterial, pero no cefalea¹²³. Esto conduce a pensar que la vasodilatación podría ser un epifenómeno no necesario ni suficiente para desencadenar una crisis de migraña¹²⁴. En estudios de experimentación animal se ha comprobado que la estimulación del ganglio del V par craneal provoca un aumento del flujo cerebral y estimula la liberación del VIP¹²⁵. El VIP se libera preferentemente en las regiones cerebrales anteriores y este hecho podría conferir una mayor susceptibilidad para la aparición del fenómeno de DCP en las regiones posteriores del cerebro.

El PACAPo péptido activador de la adenilato-ciclasa pituitaria se descubrió en 1998 y se le dio este nombre al ver que actuaba incrementando los niveles de AMP_c de las células hipofisarias facilitando la liberación hormonal, aunque sus acciones biológicas son muy variadas e incluyen fenómenos de vasodilatación. Administrado a pacientes con migraña y a sujetos control es capaz de provocar la aparición de cefaleas precoces y vasodilatación medida por Doppler transcraneal en ambos grupos, y migrañas tardías en el grupo de pacientes con migraña¹²⁶.

La sustancia P y la NKA pertenecen a la familia de las taquininas. La NKA es un neuropéptido que participa en procesos de vasodilatación y extravasación proteica. La sustancia P es uno de los neuromoduladores y neurotransmisores más importantes del cerebro. Se une de forma preferente al receptor 1 de la neuroquinina (NK-1) y participa tanto en la vasodilatación como en el incremento de la permeabilidad vascular. A concentraciones elevadas es capaz de estimular la liberación de metaloproteasas de matriz mientras que a bajas concentraciones disminuye su presencia. El endotelio presenta receptores TACR1 (receptor para la taquinina 1), que se activan tanto por la SP como por la NKA. Su estimulación condiciona un aumento de la permeabilidad vascular responsable de la extravasación proteica¹²⁷. En estudios de experimentación animal se ha comprobado que los animales *knockout* para TACR1 no son capaces de generar una respuesta inflamatoria a estímulos con SP, NKA y ET-3¹²⁸. La estimulación del ganglio del trigémino tanto en humanos como en animales de experimentación incrementa la liberación de sustancia P y de CGRP⁵⁰.

La endotelina-3 es una proteína miembro de la familia de las endotelinas (se incluyen la endotelina 1, 2 y 3), péptidos vasoactivos con una amplia variedad de funciones biológicas. La endotelina 1 presenta una acción eminentemente vasoconstrictora y es sintetizada tanto en el endotelio como por las neuronas y la glía, mientras que la endotelina 3 ejerce una acción vasodilatadora al unirse al receptor EDNRB (receptor de

la endotelina tipo B) presente en la pared vascular y es sintetizada por el tejido cerebral neuronal y glial.

44

La hipótesis vascular hoy en día se ha sustituido por una teoría que agrupa tanto mecanismos vasculares como neurogénicos: en el tronco cerebral existiría un “generador” (*locus coeruleus* y núcleos del rafe) y su activación pondría en marcha los fenómenos corticales responsables del aura y estimularía el sistema trigémino-vascular, originando la inflamación estéril y la vasodilatación de las arterias craneales extracerebrales responsables del dolor (figura 10)^{1, 129}.

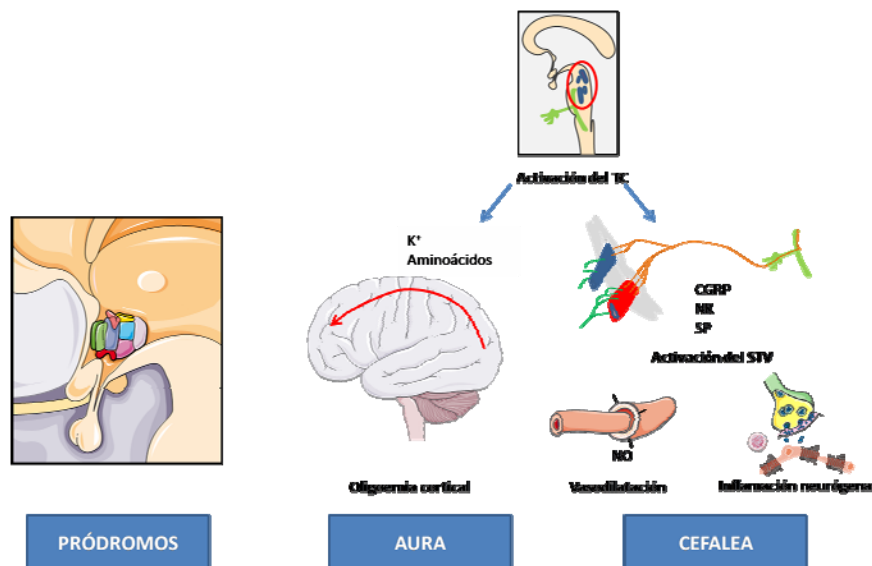


Figura 10: Fisiopatología de la migraña e implicación de mecanismos vasculares

En los últimos años el estudio del endotelio vascular ha cobrado especial relevancia para intentar completar las hipótesis acerca de la fisiopatología de este cuadro y ha sido objeto de numerosas investigaciones. También se ha profundizado en el estudio del papel de determinadas moléculas de acción vasodilatadora (CGRP, NO) en la génesis de la migraña. Sin embargo, por el momento, no se ha podido dar respuesta de forma global a la posible implicación de una alteración en la función endotelial y a la cascada inflamatoria y vascular que se pone en marcha durante la crisis de dolor.

1.2. ENDOTELIO

1.2.1 RECUERDO ANATÓMICO

Es un epitelio plano simple constituido por células endoteliales que recubre el interior del sistema circulatorio: arterias, venas, vasos linfáticos, capilares y cámaras cardíacas (donde recibe el nombre de endocardio) hasta tal punto que, en los capilares, es el único conformante de su pared. Constituye una barrera entre la luz del vaso y el resto de la pared vascular y su morfología aplanada reduce la turbulencia del flujo sanguíneo permitiendo una circulación más fluida (figura 11)¹³⁰.

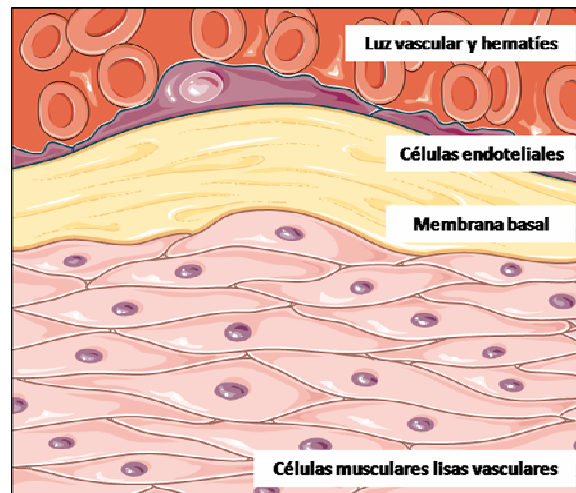


Figura 11: Endotelio y células musculares lisas vasculares

Cubre una superficie de aproximadamente 5000 m² y en conjunto pesa alrededor de 3'5 kg constituyendo el 5% del peso corporal de un adulto de 70 kg de peso.

Las células endoteliales son aplanadas (miden 10-15 μm de ancho en la porción nuclear y $\leq 1 \mu\text{m}$ en las regiones más periféricas) y alargadas (25-50 μm de largo) cuyo eje mayor se dispone en paralelo a la dirección del flujo sanguíneo. Descansan sobre una membrana basal y ésta, a su vez, sobre tejido conjuntivo. En el interior de la célula, en su porción más central y prominente, se sitúa el núcleo. Su superficie celular está recubierta por receptores que permiten al endotelio realizar funciones muy diversas. Hay tres tipos de uniones que separan o interconectan a las células endoteliales entre sí: uniones gap (estructuras comunicantes que permiten el paso de pequeñas moléculas entre células vecinas y que pueden abrirse o cerrarse en función de la necesidad, en respuesta a

señales extracelulares), unión unidireccional, estrecha u oclusiva (unión impermeable a la difusión de moléculas que permite mantener la polaridad celular, formada por proteínas de membrana) y unión adherente (formada por proteínas transmembrana y que sirve para dar resistencia mecánica a la célula)¹³¹. A través de ellas se limita el transporte de sustancias.

Las células endoteliales consumen una gran cantidad de energía debido al metabolismo tan activo que presentan. Aunque antes se consideraba que su función era únicamente ejercer de barrera física inerte entre la sangre y el músculo liso vascular hoy se sabe que permiten el intercambio de sustancias (gases, macromoléculas) entre la sangre y los tejidos¹³². Se le reconocen una amplia variedad de funciones que convierten al endotelio en la glándula endocrina, autocrina y paracrina más extensa del organismo, siendo capaz de producir más de 60 moléculas diferentes¹³³.

Su localización estratégica le permite detectar precozmente cambios en diferentes factores hemodinámicos (presión, fuerzas de rozamiento) y señales extracelulares (sustancias vasoactivas), que generan mensajes intracelulares y conllevan la activación de genes y la síntesis molecular, permitiendo así al endotelio responder a los diferentes estímulos mediante la liberación de sustancias biológicamente activas autocrinas y paracrinas. La liberación equilibrada de estas sustancias lo convierte el regulador más importante de la homeostasis vascular¹³⁴.

Entre sus funciones más destacadas figura el mantenimiento del tono vascular (vasodilatación-vasoconstricción), la regulación del crecimiento celular vascular (procesos de angiogénesis), la regulación de la adhesión leucocitaria y plaquetaria, la regulación de la trombosis y la fibrinólisis y la mediación de la inflamación¹³⁵⁻¹³⁶.

Existen diferencias tanto estructurales como funcionales en el endotelio de los diferentes órganos y entre las distintas especies animales. Las células endoteliales de la BHE presentan un fenotipo específico sin fenestraciones en la pared, con transporte pinocítico escaso y extensas uniones oclusivas, que permiten un estricto control del intercambio de sustancias y fluidos entre el plasma y el espacio intersticial¹³⁷.

Por todo ello, hoy es objeto de numerosas investigaciones y se conoce que la alteración en sus funciones (disfunción endotelial) es responsable de enfermedades tan prevalentes como la arteriosclerosis o la HTA e interviene en mecanismos de trombosis, hemorragias o sepsis.

1.2.2. FISIOLÓGÍA DEL ENDOTELIO

Las funciones del endotelio son múltiples y complementarias, con el objetivo de compensar los cambios que suceden y mantener, de esta forma, la homeostasis del organismo (figura 12). A continuación se detallan las funciones más importantes (tabla 3):

FUNCIONES DEL ENDOTELIO	
1.	Facilitar el flujo laminar de la sangre
2.	Constituir una barrera permeable que permita el paso controlado de sustancias entre el plasma y el intersticio celular
3.	Regular la angiogénesis y la remodelación vascular
4.	Contribuir a la formación y al mantenimiento de la matriz extracelular
5.	Producir sustancias reguladoras de la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis
6.	Participar en la respuesta inmune e inflamatoria
7.	Liberar agentes con acción paracrina sobre las células musculares lisas vecinas, regulando su contracción. Se liberan tanto sustancias vasoconstrictoras (endotelinas, tromboxano A2) como vasodilatadoras (NO, prostaciclina)
8.	Producir factores de crecimiento

Tabla 3: Funciones del endotelio

Facilitación de un flujo de sangre laminar

La superficie aplanada del endotelio facilita un flujo laminar de la sangre y evita de esta forma la adherencia plaquetaria.

Barrera permeable y selectiva

Permite el intercambio selectivo de solutos y fluidos entre la sangre y el espacio extracelular. Impide la pérdida de proteínas desde el torrente circulatorio, para mantener la presión oncótica y estabilizar la cantidad de fluidos a ambos lados de la pared endotelial. También sirve para regular el paso de nutrientes, nitritos, hormonas u otros mensajeros celulares. Existen dos vías de transporte: transcelular o “transcitosis”, ya que el paso

de moléculas se realiza a través de vesículas (permiten el paso de moléculas de igual o mayor tamaño que la albúmina a través de la internalización de caveolas y su desplazamiento hacia la superficie basal del endotelio y posterior exocitosis mediante mecanismos dependientes de la caveolina-1, regulándose así el transporte de albúmina e inmunoglobulinas para permitir un control adecuado de la presión oncótica y de mecanismos de defensa) y a través de las uniones intercelulares o “vía paracelular” (que se regula mediante segundos mensajeros que elevan las concentraciones de calcio intracelular y resultan en una apertura de las uniones oclusivas y adherentes)¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Regulación de la angiogénesis

El endotelio regula la formación de nuevos vasos sanguíneos, que puede suceder de manera fisiológica (en situaciones de crecimiento en la etapa fetal y que continúa a lo largo de la vida adulta para formar vasos en los diferentes tejidos) y de forma patológica (con un menor grado de organización estructural y funcional) en situaciones como cicatrización de heridas, infartos, procesos inflamatorios o crecimiento tumoral¹⁴¹.

Hoy en día se conoce el papel clave de moléculas como el VEGF en estos procesos y la participación de las células progenitoras endoteliales.

El VEGF (en particular el subtipo VEGF-A) es la molécula reguladora más importante en los procesos de angiogénesis y sus receptores (VEGFR1

y VEGFR2) se localizan fundamentalmente en la superficie de las células endoteliales. El VEGF y el b-FGF inducen la migración y proliferación de células endoteliales, promueven la secreción de proteinasas para la degradación de membrana basal y dirigen la formación de tubos vasculares a partir de la población de células endoteliales en crecimiento.

Las células progenitoras endoteliales (debido a su capacidad para diferenciarse en células endoteliales maduras), están implicadas en estos procesos y contribuyen al mantenimiento del endotelio al reemplazar células endoteliales dañadas¹⁴²⁻¹⁴³.

Las metaloproteasas también participan en el remodelamiento vascular favoreciendo modificaciones en la composición y en el tamaño del vaso¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

Formación y mantenimiento de la matriz extracelular

Participa en la síntesis de colágeno tipo IV (que constituye la lámina basal de los epitelios y endotelios), colágeno tipo V, laminina, elastina, mucopolisacáridos (como el heparán sulfato, el dermatán sulfato y el condroitín sulfato) o fibronectina¹⁴⁶.

Producción de sustancias reguladoras de la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis

52

El endotelio también regula el equilibrio necesario entre trombosis y fibrinólisis mediante la síntesis y liberación de varias sustancias, tanto protrombógenas como antitrombógenas, fibrinolíticas y antifibrinolíticas¹⁴⁷⁻¹⁴⁸.

Algunos de los factores hemostáticos y trombolíticos liberados por la célula endotelial son la trombina, el factor tisular, el factor de von Willebrand, la trombomodulina, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) o el inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1 (PAI-1).

La trombina es una enzima de acción proteolítica que degrada el fibrinógeno a monómeros de fibrina con capacidad para formar redes tridimensionales que atrapan en su interior a otras moléculas y células sanguíneas formando coágulos.

El factor tisular, factor III o tromboplastina está ausente en las células endoteliales en condiciones fisiológicas pero, ante una disrupción del endotelio, el factor tisular de los fibroblastos se pone en contacto con la sangre y también se expresa en la pared celular endotelial. Esto desencadena la activación de la vía extrínseca de la coagulación (se produce una interacción entre la tromboplastina, el factor VII y el calcio y se acelera la activación del factor X de la coagulación, que es el que regula

el paso de protrombina a trombina conjuntamente con el factor V activado y calcio).

El endotelio también produce y libera factor V, que contribuye a sus funciones procoagulantes.

El FvW es una proteína cuya síntesis depende fundamentalmente de la célula endotelial e interviene en la hemostasia al impedir la agregación plaquetaria a una superficie endotelial dañada.

La trombomodulina es una proteína presente en la membrana del endotelio y también soluble en plasma: por un lado inhibe las acciones procoagulantes de la trombina y por otro promueve la activación de la proteína C por parte de la propia trombina, como mecanismo de autorregulación de la cascada de la coagulación. La proteína C activada, en presencia de proteína S, inactiva a los factores V y VIII (impidiendo, por tanto, la activación del resto de la cascada, que desembocaría en la formación de fibrina).

El t-PA y el PAI-1 son moléculas de acción antagónica implicadas en la fibrinólisis. El t-PA transforma el plasminógeno en plasmina, molécula capaz de degradar la fibrina. Se sintetiza en el endotelio vascular de forma basal o en respuesta a estímulos, como la propia trombina. El PAI-1 es un inhibidor específico del t-PA.

El endotelio también sintetiza heparán sulfato, que se une a la antitrombina III en las inmediaciones del endotelio con la consiguiente inactivación de la trombina¹⁴⁹.

Modulación de la respuesta inmune e inflamatoria

Las células endoteliales expresan diversos receptores que modulan las respuestas inmunes e inflamatorias¹⁴⁶.

Expresan antígenos del sistema ABO (sistema antigénico eritrocitario o, más propiamente, “histohemático”), y del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II. La expresión del CMH de clase I (HLA-A y HLA-B) se induce por citoquinas (α , β e INF- γ), TNF- α y linfotoxina. La expresión del CMH de clase II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) se induce por el INF- γ ¹⁵⁰. El CMH no es igual en todo el sistema vascular sino que existe una variabilidad antigénica tejido a tejido. La célula endotelial en reposo no expresa antígenos del CMH clase II.

Existen evidencias de que la célula endotelial puede actuar como presentadora de antígenos y poseer capacidad fagocítica¹⁴⁶.

La adhesión de los leucocitos al endotelio se considera un requisito indispensable para la generación de una respuesta inflamatoria y es regulada conjuntamente por fuerzas físicas (como las cargas de superficie) y por receptores específicos de membrana. Las células endoteliales tienen

un papel activo en la adherencia y paso de células a través de los espacios interendoteliales y de diversas moléculas por los poros intracelulares. Su papel más importante guarda relación con la adherencia de los leucocitos y el paso de células y solutos fuera del vaso sanguíneo. La ICAM-1 es una molécula de adhesión intercelular que media esta unión entre leucocito y célula endotelial al unirse a una integrina presente en el leucocito (LFA-1)¹⁵¹. La MAC-1 presente en macrófagos y granulocitos también desempeña el papel de ligando de receptores endoteliales. Esta adhesión entre las distintas células inmunológicas y el endotelio es estimulada por moléculas como la interleuquina-, el TNF- α , el factor activador de plaquetas, la prostaciclina, el factor estimulador de colonias granulocitomonocito o el factor de crecimiento derivado del endotelio²⁰.

Estas moléculas de adhesión se elaboran por el endotelio cuando es disfuncionante y son neutralizadas por el óxido nítrico cuando la función endotelial es normal.

Regulación del tono muscular liso

El endotelio mantiene el tono vascular en el punto exacto para conservar la presión arterial en valores normales al mismo tiempo que permite una adecuada perfusión tisular. Este equilibrio se alcanza mediante la síntesis de determinados agentes vasodilatadores y vasoconstrictores.

Entre las sustancias vasodilatadoras destaca el óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de la L-arginina por la isoforma endotelial de la enzima sintasa del NO (eNOS)^{119, 152}. Produce una disminución de las concentraciones de calcio intracelular en la célula muscular lisa por mecanismos dependientes de GMPc y provoca así la relajación muscular con la consiguiente disminución del tono vascular. Otras moléculas vasodilatadoras sintetizadas por el endotelio son la prostaciclina (PGI₂), la bradiquinina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio.

También secreta sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1, el tromboxano A₂, la prostaglandina F₂-α o el anión superóxido en respuesta a determinados estímulos (hipoxia, distensión arterial, exposición a determinadas sustancias vasoactivas). La enzima convertidora de la angiotensina, la molécula vasoconstrictora más potente del organismo, también se expresa en las células endoteliales pulmonares, y regula el paso de angiotensina I a angiotensina II.

La célula endotelial mantiene el equilibrio entre vasodilatación y vasoconstricción al poseer la capacidad de detectar mediante mecanorreceptores situados en la pared de la célula endotelial (que son sensibles al flujo y abren canales de potasio transmembrana de forma selectiva) un mayor roce del flujo sanguíneo contra la pared celular, con la síntesis de óxido nítrico como respuesta¹⁵³. El aumento de la velocidad del flujo sanguíneo conlleva un incremento en la producción del NO,

provocando una vasodilatación que permite un incremento del aporte sanguíneo tisular.

La disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio a través del óxido nítrico es la manifestación más precoz de la disfunción endotelial.

Producción de factores de crecimiento

El endotelio actúa como un modulador del crecimiento celular mediante la producción del factor de crecimiento plaquetario, el factor de crecimiento fibroblástico básico o el insulinoide 1.

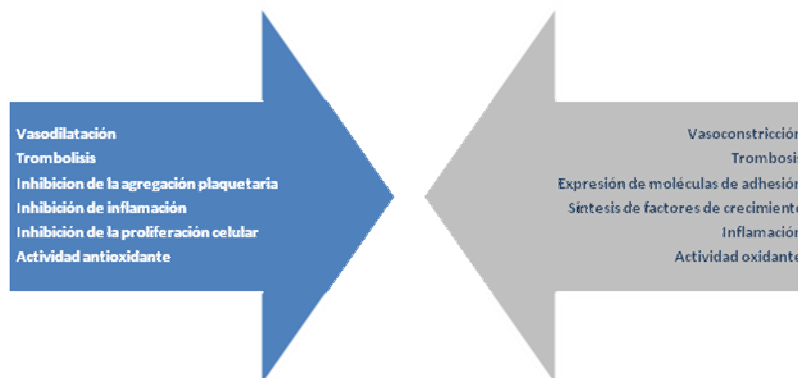


Figura 12: Endotelio y mantenimiento del equilibrio vascular

1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

58

1.3.1. CONCEPTO

En condiciones fisiológicas el endotelio regula la homeostasis vascular al actuar cada célula endotelial como un detector de señales que es capaz de generar una respuesta y de transmitirla al entorno vascular y también a distancia por la circulación sanguínea. Las células endoteliales son capaces de detectar los cambios físicos (estrés mecánico hemodinámico) y químicos (liberación de moléculas en el entorno) y ejecutar una respuesta funcional adaptativa.

La disfunción endotelial (DE) consiste en una alteración de la estructura y/o de la función del endotelio por una agresión vascular continuada. De esta forma el endotelio no es capaz de responder de una manera adecuada a los distintos estímulos y supone una pérdida para la modulación de la respuesta fisiológica del lecho vascular¹⁵⁴. El deterioro de esta función generalmente precede a los cambios estructurales en la pared vascular¹⁵⁵.

Su descripción inicial se realizó en pacientes con insuficiencia renal crónica que presentaban alteraciones complejas de la hemostasia al coexistir clínica hemorrágica con un riesgo cardiovascular elevado. Investigaciones en estos pacientes permitieron identificar biomarcadores presentes en sangre periférica como el FvW, PAI-1, trombosmodulina, endotelina y determinadas citoquinas. Posteriormente se observó una

alteración de la función endotelial (medida por el grado de alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio) ante estímulos como la isquemia, la hipertermia o la acetilcolina en pacientes con insuficiencia renal. Este concepto se aplicó a otras patologías como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, la patología coronaria o el síndrome metabólico¹⁵⁶⁻¹⁶⁰. Se ha investigado y evidenciado su papel en el desarrollo, progresión y manifestación clínica de la aterosclerosis¹⁶¹.

La importancia del concepto de disfunción endotelial reside en la facilidad para su diagnóstico (mediante la medición del grado de relajación del endotelio ante diferentes estímulos: acetilcolina, óxido nítrico, incremento de flujo o isquemia), en la posibilidad de identificar a sujetos con arteriosclerosis asintomática y con riesgo elevado de desarrollar patología aterotrombótica sintomática, y debido a la capacidad de revertir la DE (se ha comprobado que responde a diversas estrategias terapéuticas encaminadas a la reducción del riesgo vascular: administración de L-arginina, estatinas, vitamina C, otros tratamientos antioxidantes o el ejercicio físico)^{162-163, 164-165}.

La mayoría de los factores de riesgo neurovascular tanto clásicos (hipertensión, diabetes, hiperlipidemia, tabaquismo o edad) como los más recientemente implicados (hiperhomocisteinemia, estrés oxidativo, infecciones crónicas, condiciones inflamatorias sistémicas, déficit de estrógenos, predisposición genética o factores locales) se asocian con la existencia de disfunción endotelial con un riesgo acumulativo^{133, 166-173}.

En los últimos años diferentes estudios han mostrado cómo la gravedad de la disfunción endotelial se correlaciona con el riesgo cardiovascular. También se ha objetivado un peor pronóstico en pacientes con ictus isquémico y disfunción endotelial.

En enfermedades cardiovasculares se sugiere que la disfunción endotelial puede afectar al tono vascular y a la perfusión sanguínea, especialmente en situaciones de estrés.

La disfunción endotelial es el producto de la adhesión plaquetaria y monocitaria a la pared vascular, la estimulación por parte de factores de crecimiento de la proliferación de células musculares lisas vasculares, el desequilibrio entre factores trombogénicos y fibrinolíticos y una regulación anómala del tono vascular¹⁷⁴.

1.3.2. MECANISMOS PATOGENICOS

En el endotelio normofuncionante las especies reactivas del oxígeno (ROS) son neutralizadas por enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, y las restantes se emplean en la síntesis del óxido nítrico¹⁷⁵.

Las ROS son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Se incluyen los iones de oxígeno (anión superóxido), los radicales libres (radical

hidroxilo) y los peróxidos (peróxido de hidrógeno). Poseen electrones desapareados que les hacen reaccionar con otras moléculas orgánicas mediante procesos de oxidación-reducción.

Cuando se eleva la concentración de LDL oxidada en el plasma y en la pared arterial se induce una alteración endotelial que provoca la interrupción de la producción de NO. Esta situación puede llegar a desencadenar la muerte de las células endoteliales por mecanismos de apoptosis¹⁷⁶. La administración de L-arginina exógena (molécula precursora del NO) provoca una vasodilatación dependiente de endotelio en presencia de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-oxidadas). Ello sugiere que estas lipoproteínas pueden impedir o dificultar la actividad de la NOS, enzima responsable de la síntesis de NO¹⁷⁷.

Ante determinadas circunstancias (hipertensión arterial, LDL-oxidadas, VLDL, diabetes, tabaquismo e hiperhomocisteinemia) que incrementan la producción de ROS se excede la capacidad metabólica del endotelio y se provoca la síntesis intracelular de peroxinitrito¹⁷⁸⁻¹⁸². Esto desencadena la aparición de estrés oxidativo, que puede potenciarse o producirse asimismo como resultado de infecciones crónicas o inflamación de la pared vascular¹⁸³. Los estrógenos también poseen capacidad para modular la actividad de la NOS y, por tanto, la producción de NO¹⁸⁴.

Se produce una activación del endotelio que conlleva procesos de reclutamiento de leucocitos mediante moléculas de adhesión (L-selectinas

expresadas por los leucocitos y E y P-selectinas expresadas por el endotelio mediante mecanismos de transcripción mediados por el factor nuclear Kb) y posterior migración transendotelial¹⁸⁵⁻¹⁸⁶. El NF-Kb promueve la producción de sustancias proinflamatorias como las citoquinas (IL-1b, TNF- α) en la pared arterial, y estas moléculas actúan localmente activando a otras células (linfocitos) que a su vez generan nuevas interleuquinas (IL-6). Todas ellas inducen al NF-Kb, provocando que el estado inflamatorio se perpetúe.

El estrés oxidativo forma parte de los mecanismos subyacentes a la disfunción endotelial y, como puede derivar en apoptosis de las células endoteliales, favorece secundariamente la aparición de túneles en el endotelio que posibilitan la migración leucocitaria.

Las plaquetas también modulan la respuesta inflamatoria en la disfunción endotelial. Pueden activar moléculas inflamatorias que incrementan y perpetúan esta disfunción y promueven la adhesión leucocitaria a través del estímulo del NF-Kb (IL-1 β , tromboxano A2, CD40) y facilitan la proliferación de las células musculares lisas vasculares mediante la liberación del ligando del CD40 (cuyo receptor se expresa en células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas de la pared vascular)¹⁸⁷.

Las metaloproteinasas de matriz, especialmente la MMP-9, participan en el proceso inflamatorio. La degradación de la matriz

extracelular provocada por la MMP-9 es un requisito necesario para la migración de leucocitos a través del endotelio¹⁴⁴. Su secreción se estimula en respuesta a la acción de la angiotensina II, las LDL-oxidadas, las ROS y las interleuquinas, todas ellas sustancias que desencadenan el estrés oxidativo¹⁸⁸⁻¹⁸⁹.

El endotelio también posee mecanismos para defender su integridad tanto biológica como mecánica. La familia de receptores activados proliferadores de peroxisomas (PPAR α , γ y $\beta\delta$) y sus agonistas constituyen mecanismos complejos que antagonizan la progresión de la alteración de la función endotelial al incrementar la síntesis de NO, inhibir al NF-Kb, bloquear al receptor tipo I de la angiotensina II, disminuir los niveles de CD40L soluble, inhibir la liberación de MMPs o inhibir el crecimiento y migración de las células lisas vasculares¹⁹⁰. Las plaquetas, al adherirse al endotelio, liberan el PDGF que contribuye a reparar los daños que puedan existir en su superficie¹⁹¹. Las células progenitoras endoteliales participan en la lucha contra la disfunción endotelial al reendotelizar el endotelio dañado, siendo fundamentales para mantener la integridad del endotelio vascular¹⁹².

1.3.3 MÉTODOS DE VALORACIÓN

Se han desarrollado diferentes métodos para medir la función endotelial en humanos.

1.3.3.1. MÉTODOS ULTRASONOGRÁFICOS

64

Existen diferentes determinaciones que reflejan el estado del endotelio. El método ultrasonográfico más ampliamente estudiado y empleado para la evaluación de la función endotelial es la vasodilatación dependiente de endotelio (VDE).

En humanos la respuesta vasodilatadora del sistema vascular se había estudiado fundamentalmente en arterias coronarias (mediante angiografía coronaria) y arterias periféricas (mediante pletismografía en extremidades, principalmente en la arteria humeral), tras administrar sustancias farmacológicas. El estudio pletismográfico fue el más empleado por su inocuidad para el paciente y su fácil realización¹⁹³. Se realiza colocando esfigomanómetros en las extremidades para obtener medidas seriadas de la presión arterial sistólica y se conectan a un aparato que obtiene el volumen y la onda del pulso registrados. Las variaciones en el flujo de la arteria humeral se medían en respuesta a una vasodilatación que dependía de un endotelio normofuncionante (tras administración intraarterial de acetilcolina) e independiente de la función endotelial (tras administración intraarterial de nitratos). Esta arteria, aunque no suele desarrollar arteriosclerosis, mantiene una estrecha relación con la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio de las arterias coronarias¹⁹⁴.

Existe una respuesta fisiológica del endotelio frente a la acetilcolina endógena. Se libera desde las terminaciones nerviosas de la adventicia y provoca la apertura de canales de calcio en la superficie de las células endoteliales. El calcio entra en la célula, se une a la calmodulina y este complejo estimula a la NOS, que produce NO. El NO provoca, al actuar sobre las células musculares lisas adyacentes, una dilatación vascular. Si la administración es exógena, la interacción con el endotelio se produce desde su superficie luminal, y su acción depende del efecto neto del NO sobre la musculatura lisa. Los primeros autores en describir las diferencias en la respuesta a la acetilcolina fueron *Ludmer y cols.*¹⁹⁵. Ante la presencia de un daño endotelial la respuesta que se produce es vasoconstrictora debido a que la acetilcolina actúa directamente sobre los receptores muscarínicos del músculo liso vascular. Esta respuesta ha recibido el nombre vasoconstricción paradójica¹⁹⁵. La nitroglicerina (al ser un donante de NO) induce una vasodilatación que no depende del endotelio y que no se altera en pacientes con respuesta paradójica frente a acetilcolina por daño endotelial. Es por ello por lo que se relaciona la ausencia de respuesta vasodilatadora de acetilcolina con una respuesta inadecuada del endotelio¹⁹⁶.

Al administrar a sujetos normales inhibidores de la enzima sintasa del óxido nítrico como el L-NMMA (análogo de la L-arginina que compite con ella en la unión al receptor) se produce una vasoconstricción. Esto implica que existe una producción y una liberación continua de NO que regula el tono vascular en condiciones fisiológicas¹⁹⁷. El L-NMMA también

bloquea la respuesta a la administración de acetilcolina en sujetos normales pero no la respuesta vasodilatadora a nitratos, lo que vuelve a sugerir que el efecto vasodilatador de la acetilcolina está mediado por la liberación de NO¹⁹⁷. Esta respuesta vasoconstrictora tras la administración de acetilcolina se ha evidenciado en pacientes con patología coronaria mediante estudios angiográficos y se considera un signo de disfunción endotelial¹⁹⁸.

Tras estas observaciones que implican metodología invasiva (administración de fármacos por vía intravenosa u objetivación de respuesta mediante angiografía) se intensificó la búsqueda de un método de medición de la DE que fuera inocuo y permitiera la realización de determinaciones sucesivas para constatar la evolución de la función endotelial ante determinadas patologías crónicas o para realizar estudios en pacientes presintomáticos.

Vasodilatación dependiente de endotelio

El primer empleo de ultrasonidos en arterias periféricas para este fin tuvo lugar en 1992 por *Celermajer y cols.*¹⁹⁹. Empleando ultrasonidos de alta resolución se midió el diámetro de las arterias braquial y femoral en situación basal, durante una hiperemia reactiva y tras la administración de nitratos en 50 sujetos sanos, 20 fumadores, 10 niños con hipercolesterolemia familiar y 20 pacientes con enfermedad coronaria establecida. Se observó una vasodilatación mediada por flujo en todos los

sujetos controles y unos valores reducidos o FMD ausente en el resto de pacientes. La vasodilatación en respuesta a la administración de nitratos estaba presente en todos los grupos. Así se evidenció cómo la DE está presente desde pacientes en edad infantil hasta adultos con factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (hipercolesterolemia familiar e tabaquismo) antes de que se objetiven alteraciones estructurales, señalando la importancia de la DE en el desarrollo de la aterogénesis.

La vasodilatación mediada por flujo en la arteria braquial es un método validado, no invasivo y fisiológico ampliamente empleado hoy en día en la cuantificación de la función endotelial¹⁹⁹. Las mediciones también se pueden realizar en la arteria radial y en la arteria femoral.

Es un fenómeno fisiológico caracterizado por una dilatación vascular en respuesta a un incremento del flujo sanguíneo que determina un aumento del estrés de cizallamiento (estímulo mecánico que resulta del paso del flujo sanguíneo a lo largo de las células endoteliales)²⁰⁰. Uno de los principales mediadores de este mecanismo es el óxido nítrico derivado del endotelio^{199, 201-202}. La hiperemia induce la liberación de óxido nítrico por parte del endotelio, y éste actúa directamente sobre las células musculares lisas provocando una vasodilatación.

En la membrana de las células endoteliales existen canales de potasio que se abren en respuesta al estímulo mecánico y se produce una salida de potasio de la célula²⁰³. Esto genera un estado de

hiperpolarización en la propia célula y se facilita así la entrada de calcio. El calcio (Ca^{2+}) se une a la calmodulina y este complejo activa a la eNOS y se genera el NO responsable de la VDE²⁰⁴⁻²⁰⁵. El NO difunde hacia las células musculares lisas adyacentes, y allí activa a la guanilato ciclasa soluble para incrementar los niveles de GMP_c . El GMP_c provoca la relajación del músculo liso al provocar la disminución de los niveles de calcio inhibiendo la vía del fosfoinositol (figura 13). Si el estrés de cizallamiento se mantiene durante varios días, se activa la transcripción de la eNOS²⁰⁶.

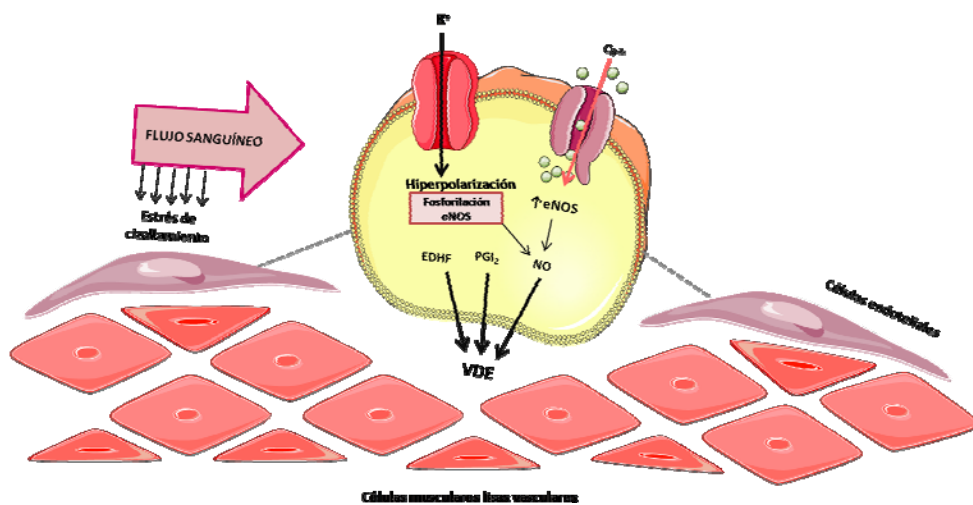


Figura 13: Influencia del estrés de cizallamiento en la producción de NO

El NO es el principal mediador de la VDE pero no es el único, ya que en cultivos celulares se ha evidenciado, en respuesta al estrés de cizallamiento, liberación tanto de NO como de prostaglandinas (PGI₂), EDHF, ET-1 y acetilcolina²⁰⁷⁻²¹⁰. Determinados cambios, como pueden ser

un tiempo de oclusión superior a 5 minutos, la compresión en la parte proximal de la extremidad o la oclusión intermitente del puño durante la determinación, pueden inducir una VDE no dependiente de NO¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Al someter a una arteria periférica a una compresión mecánica con la posterior liberación de esa compresión se induce un incremento del flujo sanguíneo a través del vaso (hiperemia reactiva) que provoca un aumento temporal en el estrés por cizallamiento en dirección perpendicular a la corriente del flujo sanguíneo¹⁷³. Esto supone un estímulo mecánico reconocido por el endotelio vascular.

Se determina la vasodilatación secundaria al incremento de flujo sanguíneo²¹¹. Las mediciones deben realizarse de acuerdo a unas guías internacionales²¹².

Definimos la VDE como el porcentaje de cambio entre el diámetro del vaso tras una hiperemia reactiva (D2) y el diámetro en condiciones basales (D1).

$$\text{Vasodilatación dependiente de endotelio} = \frac{(D2-D1) / D1}{\square} \times 100$$

Los valores normales de incremento de flujo en sujetos sanos suponen un 7-10% en relación con el diámetro basal del vaso^{200, 213}.

En pacientes que presentan factores de riesgo vascular o patología cardiovascular establecida se reduce este porcentaje de cambio o incluso está ausente (0-5%)²¹⁴.

Existen diversos factores que pueden afectar la magnitud de la VDE. El estrés de cizallamiento es proporcional a la viscosidad y a la velocidad de la sangre y se relaciona de manera inversa con el diámetro del vaso. De esta fórmula se deduce que a mayor diámetro del vaso, el porcentaje de cambio del diámetro explorado será menor (debido a un menor estrés mecánico)²¹⁵.

$$\text{Estrés de cizallamiento} = \frac{\text{Viscosidad} \times \text{Velocidad}}{\text{Diámetro arterial}}$$

Otros factores que también pueden influir son la edad (incremento del diámetro vascular y alteración de la función endotelial con la edad), el sexo (diámetro vascular menor en mujeres y mayores niveles de estrógenos que condicionan una mejor respuesta), el período del ciclo menstrual (por determinar variaciones en los niveles de estrógenos), la hora del día (existen variaciones con el ritmo circadiano), determinadas consideraciones técnicas (como la temperatura de la sala, la posición del

miembro a explorar, la duración de la oclusión, la realización de ejercicio con la mano de la extremidad a explorar), condiciones físicas (el ayuno, la realización de ejercicio aeróbico ligero previo que favorecería una mejor respuesta), las resistencias vasculares o el daño medular (por condicionar un menor diámetro vascular) (tabla 4)^{134, 173, 214, 216-218}.

Consideración aparte merecen los factores de riesgo vascular mencionados previamente (HTA, colesterol, tabaquismo, enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular) u otras enfermedades crónicas (hiperparatiroidismo, psoriasis, Behçet o lupus)^{133, 219-224}.

FACTORES QUE PUEDEN ALTERAR LA VDE ²²⁵
Estrés de cizallamiento
Edad
Sexo
Ritmo circadiano
Ciclo menstrual
Elementos técnicos (temperatura de la sala, posición de la extremidad, duración de la oclusión)
Condiciones físicas (ayuno, ejercicio previo)
Daño medular
Resistencias vasculares
Factores de riesgo vascular (HTA, DM, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, patología coronaria, obesidad, tabaquismo activo o pasivo)
Historia familiar de patología vascular (DM, patología coronaria)
Bajo peso al nacimiento

Tabla 4: Factores que influyen sobre la determinación de la VDE

Para la determinación de la VDE el paciente debe colocarse en decúbito supino con la extremidad superior dominante extendida y con la palma hacia arriba. Se localiza la arteria braquial en un corte longitudinal a una distancia entre 3-5 cm por encima del codo en la fosa antecubital mediante una sonda de Doppler. Se realizan determinaciones basales del diámetro del vaso y determinaciones tras la hiperemia reactiva que se produce tras liberar una compresión entre ≥ 50 mmHg de la TAS basal del paciente y 300 mmHg, según diferentes recomendaciones, durante un período de tiempo que oscila entre 4 y 5 minutos según las distintas series. La medición durante la hiperemia se realiza a los 60-90 segundos tras la liberación de la compresión. A continuación se comparan ambas determinaciones. Las condiciones ideales para su determinación son las siguientes (tabla 5)²¹²:

CONDICIONES IDEALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VDE ²²⁵
Temperatura constante en la habitación de exploraciones (22-24°C)
Habitación silenciosa
Examen a las 7:00 horas a.m.
Posición en decúbito supino con la extremidad superior dominante en posición anatómica y la mano en estado de reposo
Ayuno en las 8 horas previas (que incluya cafeína o vitamina C)
No consumo de tabaco en las 6 horas previas
No ejercicio previo, no trabajo nocturno, no estrés psicológico
Considerar el día del ciclo menstrual
Ausencia de consumo de drogas vasoactivas al menos 4 veces el tiempo de vida media

Tabla 5: Condiciones ideales para la realización de VDE

Al tratarse de un estudio no invasivo es posible realizar determinaciones repetidas a lo largo del seguimiento de los pacientes en riesgo o con patología ya establecida, y estudiar la eficacia de intervenciones terapéuticas encaminadas a mejorar la salud vascular.

Estudios realizados mediante la liberación de la oclusión a diferentes tiempos confirmaron que el grado de dilatación de la arteria braquial y la duración del cambio máximo de su diámetro se incrementaban de forma proporcional al tiempo de la oclusión hasta los 4.5 minutos (momento en el que se evidencia una respuesta máxima, con dilataciones medias del 9.6%), sin mayores incrementos tras oclusiones más prolongadas²²⁶.

Se determinó el valor diagnóstico de la técnica para enfermedad coronaria con una sensibilidad del 71%, una especificidad del 81%, un VPP del 95% y un VPN del 41%²²⁷. Resultó útil para predecir la ocurrencia de episodios cardiovasculares en relación a aquellos sujetos con función endotelial normal²²⁸.

La función endotelial de arterias periféricas de fácil acceso, como es la arteria humeral, se correlaciona con la función endotelial de arterias coronarias o arterias cerebrales¹⁹⁴.

El método también es adecuado para monitorizar la presencia de actividad inflamatoria en el seguimiento de pacientes y se ha demostrado una relación entre la VDE y marcadores de inflamación como la PCR²²⁹.

Este método fue validado en estudios posteriores, que confirmaron su reproducibilidad²³⁰. Se confirmó también que la respuesta en adultos sanos permanece constante a lo largo del tiempo²¹³.

Las principales limitaciones de la técnica son la necesidad de personal entrenado y las variaciones con el ritmo circadiano (ya que pueden corresponder hasta un 25%).

La VDE se ha correlacionado de forma inversa con otro indicador subclínico de patología vascular, el índice íntima-media carotídeo²³¹. Los sujetos jóvenes con factores de riesgo vascular presentan un riesgo mayor de engrosamiento intimal especialmente en presencia de disfunción endotelial. La disminución de la VDE también se ha asociado de forma independiente con la presencia de placas de ateroma en las arterias carótidas²³².

La VDE puede inducirse mediante la infusión de determinadas sustancias farmacológicas que incrementan la liberación de NO por parte del endotelio. Sin embargo al convertirse así un método de fácil realización y no invasivo en una técnica agresiva (al administrarmedicación

intravenosa) resulta poco útil a la hora de realizar estudios que empleen sujetos controles sanos, y por ello los métodos no invasivos han sido los más empleados en estudios de investigación clínica^{135, 211}.

La VDE constituye un vaticinador independiente de patología cardiovascular y numerosos factores de riesgo coronarios se han correlacionado con una disminución significativa de la VDE²³³. Su asociación con ictus isquémico también se ha objetivado en diferentes estudios, y la VDE constituye un valor predictivo para el pronóstico del infarto, asociándose a un peor pronóstico^{219-220, 234}. El control de los factores de riesgo mejora la disfunción endotelial en pacientes que la tenían alterada previamente²³⁵.

Hoy en día es la herramienta más empleada para la medición de la función endotelial. Su respuesta es dependiente de óxido nítrico, puede afectarse en estadios precoces de la enfermedad, se altera en presencia de factores de riesgo cardiovascular, se correlaciona con anomalías en la vasodilatación dependiente de endotelio de las arterias coronarias, mejora con intervenciones destinadas a limitar o prevenir la patología vascular (como el tratamiento con estatinas) y es una técnica relativamente barata, no invasiva, y reproducible²³⁶.

La vasodilatación dependiente de endotelio se ha empleado en la valoración de patología cardiovascular, cerebral y en los últimos años se ha investigado su aplicación en la migraña.

La alteración de la VDE se ha constatado en diferentes estudios como un factor predictor independiente de riesgo vascular a largo plazo en pacientes con patología arteriosclerótica o en pacientes con enfermedad vascular establecida²³⁷. También se ha verificado su utilidad para predecir la aparición de reestenosis en pacientes con angioplastia coronaria y complicaciones tras una cirugía vascular²³⁸⁻²³⁹. Recientemente se ha comprobado que la VDE actúa como predictor independiente de riesgo cardiovascular en adultos libres de enfermedad cardiovascular y permite establecer riesgos de posibles eventos vasculares²⁴⁰.

La corrección de determinados factores de riesgo vascular ha implicado una mejoría en la función endotelial²³⁵. Se ha comprobado con el uso de estatinas, betabloqueantes, IECAs, antioxidantes (vitamina C), ácido fólico, estrógenos sintéticos o antidiabéticos. Habrá que verificar si esta mejoría en la función endotelial se relaciona, a su vez, con un menor riesgo de sufrir eventos coronarios²⁴¹.

En patología cerebrovascular su utilidad ha sido menos estudiada que en patología cardíaca. Se ha evidenciado su correlación con un mal pronóstico si está presente en pacientes con ictus isquémico en fase aguda y su presencia se ha asociado de forma independiente a pacientes con ictus isquémico de origen aterotrombótico^{220, 242}. Otro estudio reciente

intentó establecer correlaciones entre posibles variaciones en los cambios de VDEy el tipo de ictus isquémico de acuerdo con la clasificación TOAST. Concluyeron que el único tipo de ictus que presentó una disminución significativa con respecto al grupo control fue el infarto lacunar²¹⁹. El uso de atorvastatina mejoró la VDE en pacientes con antecedentes de infarto lacunar o factores de riesgo para ictus isquémico²⁴³.

Su aplicación en otras patologías sistémicas aún está por demostrar. Lo mismo sucede en entidades neurológicas, como el caso de la migraña, con resultados dispares en las escasas publicaciones realizadas hasta la fecha.

Vasodilatación dependiente de endotelio y migraña

La VDE se puede determinar de una manera sencilla en la arteria braquial al mismo tiempo que se considera un marcador de función endotelial para el árbol vascular completo. Además la vasodilatación dependiente de NO también está involucrada en los mecanismos quimiorreguladores que subyacen a la reactividad vasomotora cerebral como respuesta a la hipercapnia. Los pacientes con disfunción arterial presentan una menor respuesta en relación con la regulación vascular frente a estímulos de hiperventilación (descenso de CO₂) y de inhalación de CO₂(incremento)²⁴⁴.

Se sabe que los pacientes con migraña con aura presentan una reactividad vascular cerebral aumentada al CO₂ durante el período intercrítico, y esta respuesta es mayor que en los pacientes con migraña sin aura y en controles sanos en el lado predominantemente afectado en los ataques de migraña²⁴⁵⁻²⁴⁷. En relación al flujo sanguíneo cerebral, durante los ataques de migraña se constataron valores menores en la velocidad sistólica de la arteria cerebral media²⁴⁵.

La relación entre el posible papel del NO y la disfunción endotelial medidos por VDE en pacientes con migraña ha sido evaluada en pocos estudios con resultados dispares y predominantemente negativos (ausencia de diferencias entre migrañosos y controles)^{110, 248}. Otras investigaciones evidencian una correlación negativa entre la VDE y el padecimiento de migraña (con VDE reducida en pacientes migrañosos con respecto a controles) y teorizan acerca de una posible afectación local en la migraña en el contexto de alteraciones vasomotoras presentes de forma sistémica²⁴⁹⁻²⁵⁰.

Para evitar la posible interferencia de un consumo prolongado durante años de fármacos vasoconstrictores (triptanes, ergóticos) y para intentar dilucidar si la disfunción arterial podía ser o no el resultado de ataques de migraña repetidos, se estudió laVDE en sujetos control y en migrañas de entre 1 y 6 años de evolución, y se constató que en esas migrañas de inicio reciente ya se podía observar una disminución de laVDE²⁵⁰. Sin embargo, la VDE no alcanzó diferencias significativas entre

ambos grupos y los autores afirman que aquellos diámetros de mayor tamaño de forma basal presentan un menor porcentaje de cambio tras la hiperemia, por lo que se recomendaría que en estudios futuros se realizaran mediciones y cálculos en relación a las cifras absolutas de los cambios en los diámetros arteriales. En este estudio se evaluaron también otras arterias musculares, como la arteria temporal superficial o la arteria femoral, y se objetivó un menor diámetro de estas arterias en los pacientes con migraña, lo que podría sugerir un incremento generalizado en el tono muscular liso de los pacientes migrañosos.

	HALLAZGOS VDE/FMD	PACIENTES	EXPLICACIÓN
Vernieri y cols./2010	Aumento de VDE en migrañas con aura	MSA, MCA, controles	Sensibilidad aumentada al NO
Yetkin et al./2009	Disminución de VDE en migrañas	Migrañas y controles	Anomalías vasculares sistémicas
Vanmolkot y cols./2009	No diferencias en VDE Mayor diámetro arterial basal en migrañas	Migrañas con diagnóstico < 6 años y controles	Alteración de la función arterial en migrañas de poco tiempo de evolución
Yetkin y cols./2007	Disminución de VDE en migrañas Aumento de dilatación mediada por nitratos en migrañas	Migrañas y controles	Anomalías vasculares sistémicas
Silva y cols./2006	No diferencias en VDE	Migrañas y controles	No hay alteración de la función endotelial
De Hoon y cols./2006	VDE en respuesta a serotonina, nitratos y CGRP	Migrañas y controles	No existen cambios en la función vascular

Tabla 6: Estudios de VDE y migraña

Un estudio reciente ha recogido los valores de la VDE entre pacientes con MA, MSA y controles sanos y han observado una respuesta arterial incrementada ante la hiperemia en pacientes con migraña con aura frente al resto. Uno de los argumentos que se emplean para explicar estos hallazgos frente a las evidencias previas es una mayor resolución de imagen del aparato empleado, con una sonda de mayor frecuencia (14 MHz) que las empleadas en otros estudios (7'5-10 MHz)²⁵¹. Explican la mayor VDE en pacientes con migraña con aura por una mayor liberación de NO producida por el estrés de cizallamiento o bien por una sensibilidad incrementada a la acción del óxido nítrico, ya sugerida en otros estudios en relación con estímulos químicos (NO, CO₂)²⁵²⁻²⁵³.

Todos estos estudios han tenido lugar durante el período intercrítico y ninguno durante la crisis de migraña (tabla 6).

Aunque no se empleó la VDE para la medición del flujo arterial sino métodos pletismográficos, el trabajo de *Napoli y cols.* ilustra los mecanismos que subyacen a la disfunción endotelial en la migraña. Observaron la actividad del endotelio y de las células musculares lisas vasculares en pacientes migrañosos y controles sanos mediante pletismografía y mediante la infusión de agentes vasoactivos (acetilcolina y nitratos)²⁵⁴. Se cuantificó la producción de NO y de GMP_c. La acetilcolina se empleó para inducir la vasodilatación mediada por el endotelio y el nitroprusiato de sodio (donante de NO) como estimulador directo de las VSMCs, para establecer el grado de vasodilatación no dependiente de

endotelio. Observaron una reactividad vascular alterada en los pacientes con migraña debido a una disfunción de las VSMCs, ya que la respuesta vasodilatadora alterada frente a la acetilcolina se asoció a una producción normal de NO por parte del endotelio. La producción de GMP_c (molécula clave para que la vasodilatación tenga lugar) estaba disminuida. También se evidenció una alteración de la VDE inducida por NO en los pacientes con migraña. Ello implicaría que la alteración en la vasodilatación sería consecuencia de una mala función de las VSMCs y que, por tanto, la producción de NO por el endotelio (con un papel beneficioso en la protección frente a patología vascular) no estaría alterada en la migraña²⁵⁵.

Otras técnicas ultrasonográficas

La determinación del IMT (medida de las características morfológicas y mecánicas de la pared vascular mediante el cálculo del grosor de la capa intimal) se ha empleado fundamentalmente en pacientes con factores de riesgo vascular y patología arteriosclerótica (figura 14). Se ha investigado su relación con la VDE en series amplias de pacientes jóvenes y se ha visto que la vasodilatación mediada por flujo en la arteria braquial se correlaciona de forma inversa al IMT carotídeo. Si existe disfunción endotelial (establecida por una VDE reducida), el número de factores de riesgo vascular en adultos jóvenes guarda relación con un incremento en el IMT²³¹. En sujetos con la función endotelial conservada no se aprecia esta relación.

En migrañas hay pocos estudios que determinen el IMT con resultados dispares^{250, 256}. Se estudió la presencia de factores de riesgo vascular y se determinó la función endotelial y el IMT en la arteria carótida interna de pacientes migrañosos y se evidenció la existencia de un daño endotelial en estos pacientes, con alteración de la vasorreactividad endotelial y mayor IMT, y se comprobó su asociación con factores de riesgo vascular. Ello sugiere que la migraña podría ser un riesgo potencial para el desarrollo de aterosclerosis²⁵⁶. *Vanmolkot y cols.* habían realizado la misma medición en un estudio previo sin diferencias entre pacientes con migraña y controles²⁵⁰.

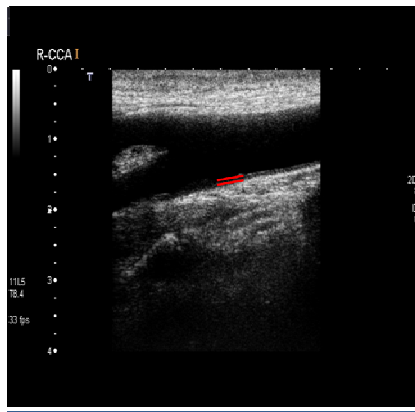


Figura 14: Medición del IMT

Se pueden realizar estudios por Doppler encaminados a determinar el grado de rigidez o de distensibilidad de la pared arterial y un aumento en dicha rigidez se ha relacionado con una disminución de la VDE (tabla 7)²⁵⁷. El registro de la velocidad de flujo en la ACM derecha tras la infusión de L-arginina puede mostrar modificaciones en la vasorreactividad

cerebral tras la administración de un precursor del NO, lo que sugiere la existencia de una función endotelial alterada²⁵⁸. También se puede estudiar la vasorreactividad cerebral en respuesta a determinados estímulos como la hipercapnia. Es posible realizar una medición de los cambios secundarios a dilatadores vasculares dependientes e independientes de endotelio mediante técnicas de velocimetría por láser Doppler. En migrañas no se encontraron diferencias con sujetos control en un único estudio realizado, con una muestra pequeña de pacientes²⁵⁹.

Además de los métodos ultrasonográficos existen otros métodos que sirven para evaluar la función endotelial: angiografía cuantitativa, variación de flujo en respuesta a acetilcolina en sonda de Doppler ubicada en arterias coronarias, pletismografía o medición de presiones segmentarias (tabla 7).

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL ²⁵⁸
Angiografía coronaria cuantitativa y administración de acetilcolina
Doppler intracoronario y determinación del flujo en respuesta a acetilcolina
VDE medida por ultrasonografía
Pletismografía con infusión de acetilcolina en la arteria braquial
Tonometría arterial periférica en respuesta a hiperemia
Estudios de distensibilidad venosa
Determinación de biomarcadores en plasma y orina

Tabla 7: Métodos diagnósticos de la función endotelial

1.3.3.2. MARCADORES MOLECULARES

84

El estrés oxidativo predispone a la DE y ésta a su vez pone en marcha mecanismos de trombosis, inflamación y reactividad vascular periférica alterada. Las moléculas relacionadas con estos procesos servirán para establecer el estado de la función endotelial (figura 15)²⁶⁰.

Para la evaluación del estrés oxidativo se determinan en plasma o en plaquetas los niveles de NO o de sus metabolitos. También se han determinado en orinalos niveles de los metabolitos de NO, nitratos y nitritos. La alteración de sus niveles en relación a sujetos control se ha relacionado con la existencia de disfunción endotelial²⁶¹⁻²⁶². También se puede medir el grado de estrés oxidativo mediante la determinación de TBARs (sustancias reactivas al ácido barbitúrico que ayudan cuantificar el grado de peroxidación lipídica) y sus niveles están elevados en sujetos con migraña²⁶¹. Otra expresión de DE es la aparición de estados protrombóticos o de hipercoagulabilidad y para su detección serán de utilidad el FvW, el fibrinógeno, el dímero D, el activador tisular del plasminógeno, la protrombina, el PAI-1, las moléculas de adhesión inhibitoras del complejo de la trombomodulina o la endotelina 1²⁶²⁻²⁶⁶.

Para el estudio de fenómenos inflamatorios implicados en la función endotelial puede ser útil la determinación de niveles de PCR-US, interleuquinas (IL-1), TNF- α , factores de crecimiento o moléculas de adhesión²⁶⁷. Entre los factores de crecimiento destacan el PDFG (factor de

crecimiento derivado de las plaquetas), el CSF (factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos), el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF-1 (factor de crecimiento derivado de la insulina) o el TGF- β (factor de transformación de crecimiento). El PDGF, el FGF y el IGF inducen la proliferación de las células musculares lisas vasculares. El CSF determina la replicación macrofágica. El TGF estimula a las macromoléculas de la matriz de colágeno. La IL-1 y el TNF- α estimulan la síntesis de PDGF. La propia PCR-US puede facilitar la expresión endotelial de metaloproteinasas de matriz y se ha documentado un incremento de la MMP-9 en las crisis de migraña⁵⁸.

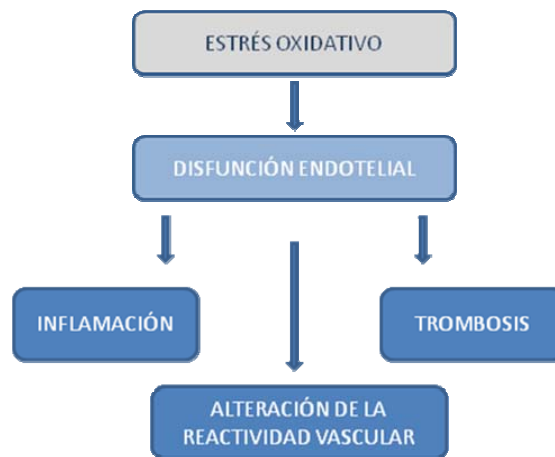


Figura 15: Influencia del estrés oxidativo en la reactividad vascular

Existen otros factores reguladores del crecimiento con actividad angiogénica (como el VEGF) que pueden relacionarse indirectamente con la función endotelial. También participa en las primeras fases de la aterogénesis al incrementar la permeabilidad endotelial²⁶⁸.

Como marcadores celulares de DE destacan las CECs y las EPCs. Las CECs (células endoteliales circulantes) constituyen un marcador de daño endotelial en sangre periférica. Se producen por daño del endotelio al descamarse células endoteliales desde la pared del vaso a la circulación periférica y no están presentes en los sujetos sanos. Se asocian a riesgo cardiovascular, a enfermedades neoplásicas malignas y a estados inflamatorios²⁶⁹. Las células progenitoras endoteliales también son marcadores de daño endotelial y se han descrito niveles reducidos en múltiples patologías que condicionan un mayor riesgo vascular, entre ellas la migraña²⁷⁰.

Entre todos estos marcadores moleculares y otros biomarcadores indicativos de la existencia de disfunción endotelial destaca el NO por su relación con los mecanismos subyacentes al desencadenamiento de una crisis de migraña. El VEGF, por su implicación tanto con los mecanismos vasodilatadores del NO como regenerativos por las EPCs, también podría estar alterado en situaciones de mal funcionamiento del endotelio.

NO: óxido nítrico

El NO es un gas biológicamente activo que tiene las propiedades de los radicales libres y que actúa como una molécula mensajera de vida corta y gran inestabilidad. También puede denominarse óxido de nitrógeno o monóxido de nitrógeno. Está presente en los mamíferos en muy pequeñas cantidades. Debido a su bajo peso molecular y a sus propiedades lipofílicas difunde a través de cualquier zona de la membrana celular para realizar su acción, sin necesidad de transporte transmembrana. En el endotelio atraviesa fácilmente la capa íntima y alcanza a las VSMCs de la pared arterial. Una vez allí, a través de la activación de la guanilato ciclasa, cataliza la síntesis de GMPc a partir de GTP, y se disminuye el calcio intracelular provocando una relajación muscular que conlleva una vasodilatación, regulándose así el flujo sanguíneo y la presión arterial²⁷¹.

Constituye el principal factor relajante derivado del endotelio y es fundamental en el mantenimiento del equilibrio adecuado para preservar la función vascular del organismo²⁷².

Su síntesis se produce a partir del aminoácido L-arginina (en su porción N-terminal) por la acción de la enzima sintasa del óxido nítrico o NOS mediante una reacción de óxidoreducción que no consume energía (ATP), en presencia de nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y O₂²⁷³. De dicha reacción también se obtiene L-citrulina.

Clásicamente se describen 3 isoformas de la enzima NOS: una forma inducible y dos formas constitutivas.

Las constitutivas (cNOS) dependen del calcio intracelular y son la forma endotelial (eNOS o NOS-III) y la forma neuronal (nNOS o NOS-I), que son capaces de sintetizar NO en condiciones fisiológicas y en pequeñas cantidades. La forma inducible depende en menor medida del calcio citosólico (iNOS o NOS-II) y no se expresa (o lo hace muy débilmente) en condiciones normales, pero cuando lo hace actúa en macrófagos, células endoteliales, hepatocitos y plaquetas, en respuesta a citoquinas o a determinados factores de crecimiento. Libera mayor cantidad de NO que las enzimas constitutivas. Los conocimientos actuales a cerca de las tres isoformas de NOS establecen límites menos precisos en las características descritas previamente²⁷⁴.

Tanto la NOS constitutiva (eNOS) como la inducible (iNOS) están presentes en células endoteliales. Cuando se administran determinadas sustancias vasodilatadoras (acetilcolina o bradiquinina) las enzimas constitutivas producen NO durante períodos cortos de tiempo, mientras que las NOS inducibles pueden sintetizar NO durante períodos temporales más prolongados, como cuando el estímulo son citoquinas proinflamatorias como el TNF- α ²⁷⁵.

Existen también moléculas capaces de inhibir a las NOS y que se han empleado en estudios de investigación como instrumentos

farmacológicos. Las más frecuentemente utilizadas son el L-NMMA, el L-NNA, el L-NAME y la aminoguanidina. La dimetil-arginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo endógeno de la eNOS.

El NO, una vez liberado, tiene una vida media es muy corta (3-5 segundos) y rápidamente se transforma en nitratos o nitritos. La oxihemoglobina y los radicales libres del O₂ son las principales moléculas que catalizan esta reacción. Ésta es la principal razón por la que el NO sólo actúa localmente (acción paracrina) y no a distancia. También actúa sobre la propia célula endotelial que lo ha generado (acción autocrina) inhibiendo la generación de más NO (mecanismo autorregulador). Su gran lipofibilidad y su facilidad para la difusión permiten que ejerza su acción sobre el músculo liso adyacente provocando su relajación, sin necesidad de que existan receptores específicos para ejercer su acción.

Existen dificultades para la determinación de NO debido a su corta vida media. En los tejidos es rápidamente oxigenado y se obtienen productos finales estables: nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻). En la circulación sanguínea la mayor parte se convierte en nitrato por acción de la hemoglobina²⁷⁶. El mejor índice para la medición de la producción de NO es la determinación de sus metabolitos estables (NO₃⁻ y NO₂⁻) o NO_x²⁷⁷.

El principal estímulo para la liberación de NO es el estrés de cizallamiento o *shear stress* causado por el aumento de la velocidad de la

sangre a través del vaso, que lleva a una vasodilatación proporcional a la cantidad de NO liberada por el endotelio²⁷⁸.

90

Esta vasodilatación se denomina vasodilatación dependiente de endotelio, a través de canales de potasio dependientes de calcio que producen una hiperpolarización de la célula endotelial, facilitando la entrada de calcio y activándose así la eNOS, que produce NO²⁷⁹. Los nitratos, al ser “donantes de NO”, liberan NO directamente a la circulación y estimulan la formación de GMPc por las VSMCs y provocan una vasodilatación que no es dependiente de la respuesta del endotelio y por eso recibe el nombre de vasodilatación independiente de endotelio. El estrés de cizallamiento induce una producción constante de NO que mantiene una vasodilatación persistente¹⁹⁵. Los niveles fisiológicos de estrés de cizallamiento que resultan protectores para el endotelio (sin riesgo de una baja formación de NO debido a niveles bajos de cizallamiento y sin riesgo de erosión endotelial por niveles elevados) oscilan entre 6 y 70 dinas/cm²²⁸⁰.

El NO, además de ser una molécula vasodilatadora, participa en otras funciones de vital importancia para el mantenimiento del endotelio: reduce la permeabilidad vascular, la síntesis de moléculas de adhesión, la agregación plaquetaria, la oxidación y la inflamación tisular, la activación de factores trombogénicos, el crecimiento, proliferación y migración celular y también inhibe la expresión de citoquinas proaterogénicas y proinflamatorias y facilita procesos de fibrinólisis (tabla 8)²⁷³.

El endotelio libera angiotensina II como antagonista del NO, molécula que facilita la vasoconstricción y otras acciones protrombóticas y aterogénicas. Por ello el efecto que prevalezca dependerá del equilibrio o desequilibrio entre estas dos sustancias.

EFFECTOS BENEFICIOSOS DEL ÓXIDO NÍTRICO
Vasodilatación (relajación de las células musculares lisas vasculares)
Inhibición de la proliferación de las células musculares lisas vasculares
Inhibición de la agregación y de la adhesión plaquetaria
Inhibición de la adhesión linfocitaria y monocitaria
Efecto antioxidante (contrarresta acción del anión superóxido)
Efecto antiinflamatorio
Disminución de la permeabilidad vascular
Inhibición de la expresión de citoquinas proaterogénicas y proinflamatorias
Facilitación de procesos de fibrinólisis

Tabla 8: Funciones del NO beneficiosas para el organismo

Se ha comprobado que la síntesis de NO derivado del endotelio disminuye en presencia de disfunción endotelial. Se determinaron la VDE y la concentración plasmática de nitritos (metabolitos estables del NO) en situación basal y durante la hiperemia reactiva tras isquemia y los niveles plasmáticos de nitritos estaban más elevados en pacientes con función endotelial normal en comparación con aquellos que presentaban disfunción endotelial²⁸¹.

El NO es una molécula clave en el desarrollo de una crisis de migraña.

Es un importante vasodilatador endógeno y, administrado a pacientes con migraña (y menos frecuentemente a controles sanos), es capaz de desencadenar una cefalea de manera inmediata, por lo que se le atribuye un papel en su fisiopatología^{109, 282-283}.

Dosis elevadas de trinitrato de glicerina provocan que pacientes con migraña desarrollen cefaleas de características migrañosas con mayor frecuencia e intensidad, y con una mayor dilatación de arterias cerebrales que los sujetos control. Tras una infusión intravenosa de esta sustancia pacientes con migraña padecen un ataque mientras que controles sanos permanecen sin cefalea²⁸⁴. Los donantes de NO inducen cefaleas de forma precoz (60 minutos) en sujetos controles y una denominada cefalea tardía (1-24 horas) en pacientes con migraña, que cumple los criterios clínicos de una MSA²⁸⁵. No obstante habría que considerar que, debido a la vida media corta de esta molécula (segundos), estas cefaleas tardías podrían no guardar relación directa con el NO, y su mecanismo aún está por dilucidar.

Se ha demostrado la existencia de fibras nerviosas que contienen NO alrededor de las arterias intracraneales y se ha sugerido un papel regulador en la liberación de neuropéptidos (CGRP, sustancia P, NKA) para el inicio del proceso inflamatorio neurogénico²⁸⁶⁻²⁸⁷. Por ello, una respuesta incrementada al NO puede no sólo implicar una vasodilatación

por acción directa del óxido nítrico en la pared vascular, sino también por una mayor liberación de CGRP desde los nervios perivasculares inducida por el propio NO²⁸⁸. En cultivos celulares de neuronas trigeminales se ha comprobado un incremento de expresión de iNOS ante situaciones de estrés celular²⁸⁹.

Se han estudiado los niveles de NO en pacientes con migraña tanto en el período intercrítico como durante el ataque de cefalea con resultados dispares.

Gallai y cols. evidenciaron que durante las crisis de migraña en las plaquetas de los pacientes con migraña existía una mayor concentración de NO₂⁻ y de NO₃⁻ (metabolitos del NO) y esto sucedía también durante el período intercrítico²⁹⁰. Las plaquetas contienen NOS, y el NO generado cuando la NOS es activada puede producir cambios en la actividad plaquetaria²⁹¹.

Nattero y cols. también observaron niveles elevados de NO durante las crisis de migraña (aunque el tamaño de la muestra era reducido, de 7 pacientes, y las diferencias eran pequeñas)²⁹². Un estudio posterior (*D'Amico y cols.*) refrendó estos hallazgos (niveles superiores de nitritos, tras conversión enzimática de los nitratos a nitritos y su posterior cuantificación global) en plasma en el período intercrítico en una muestra de 100 migrañas y 112 controles)²⁹³. Se consideró que la vía de la L-arginina-NO es hiperfuncionante en pacientes con migraña en estado

basal. Otros estudios hallaron niveles elevados de NO_x en plaquetas o en plasma de pacientes migrañosos tanto en intercrisis como en crisis o durante cefaleas de características migrañosas tras administración de donantes de NO ²⁹⁴⁻²⁹⁵.

Yilmaz y cols. estudiaron las concentraciones de NO_x en plaquetas en el período basal y en las crisis de migraña²⁹⁶. Las concentraciones fueron mayores en los pacientes con migraña durante la crisis, pero no en el período intercrisis, en relación a los niveles de los sujetos control²⁹⁷.

Otros estudios que estudiaron cambios en NO_2^- y NO_3^- en plasma, leucocitos y plaquetas en el período basal no encontraron diferencias entre migrañas y controles^{248, 298}.

Se puede inferir una variación en las concentraciones de NO mediante la medición de sus metabolitos estables en orina. Comparando los niveles de NO_x en migrañosos y controles en período basal y durante y 24 horas después de un ataque de migraña existían niveles intercríticos superiores en migrañosos, y más elevados que durante y después de la crisis. Se interpretó que obedecían, por una parte, a una biodisponibilidad reducida de NO durante la cefalea y por otra, a una posible inactivación por aniones superóxidos generados ante la presencia de estrés oxidativo y a la propia actuación de NO para contrarrestar la acción oxidante de los aniones superóxidos²⁶¹.

El empleo de inhibidores de la NOS es útil para el estudio del papel del NO en esta patología. Se conoce que la administración de un inhibidor de la NOS (546C88) a pacientes con migraña fue capaz de abortar los ataques mediante la reducción de producción de NO²⁹⁹. Existen inhibidores endógenos (como la ADMA) que regulan la producción de NO. Por su acción antagónica, niveles elevados de ADMA estimulan procesos involucrados en el desarrollo de aterosclerosis. Se encontraron niveles elevados de ADMA en diferentes patologías: diabetes mellitus, obesidad, patología tiroidea, hipertensión arterial, ictus, edad avanzada o dislipemia. También se han encontrado valores elevados en pacientes con aterosclerosis carotídea subclínica (otro indicador indirecto de disfunción endotelial)³⁰⁰. *Guldiken y cols.* han medido los niveles de NO y de ADMA en pacientes con migraña y controles sanos de forma basal y no encontraron diferencias significativas en ambos grupos³⁰¹.

A pesar de los hallazgos, en ocasiones antagónicos, de los diferentes estudios respecto a los niveles de NO en la migraña y una relación no aclarada con la función del endotelio, su papel en la fisiopatología de esta enfermedad parece clave para el desarrollo y la perpetuación de los mecanismos vasodilatadores e inflamatorios que conducen a la génesis del dolor²⁸⁵.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

El VEGF y sus receptores componen un sistema que constituye el principal regulador de la formación de vasos sanguíneos y que está

implicado tanto en la formación del sistema circulatorio en la etapa embrionaria o en procesos de neovascularización (vasculogénesis) como en el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de otros ya preexistentes (angiogénesis)³⁰²⁻³⁰³. Es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para células endoteliales. Su papel en el proceso de angiogénesis ha sido ampliamente estudiado³⁰⁴.

Se identificó en 1983 tras décadas de búsqueda de un factor estimulador del crecimiento de los vasos que permitiera un adecuado crecimiento tumoral en el cáncer, y su denominación inicial fue de “factor de permeabilidad vascular” tumoral³⁰⁵. En 1989 se aisló en laboratorio un agente mitógeno específico para células endoteliales denominado “factor de crecimiento endotelial vascular” debido a su marco de acción tan selectivo³⁰⁶. Poco después se demostró que el factor de permeabilidad vascular y el VEGF eran la misma molécula³⁰⁷.

Es un miembro de la súper-familia de genes VEGF-PDGP que incluye a diferentes subtipos de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E) y al PIGF^{141, 308}. El VEGF-A es una glicoproteína de 45 KDa y está codificado por un único gen localizado en el cromosoma 6p12. Este gen contiene ocho exones separados por siete intrones. El VEGF-A es el miembro principal, entre los distintos subtipos de VEGF y hasta el momento se conocen 6 isoformas en función del número de residuos de aminoácidos generados por un procesamiento alternativo del ARNm que difieren en su peso molecular y en sus

propiedades biológicas³⁰⁹. La isoforma VEGF-A₁₆₅ es la más común y estudiada³¹⁰. La actividad biológica la ejerce al interactuar con dos receptores específicos con actividad tirosina quinasa (RTKs), el VEGFR1 y el VEGFR2³¹¹, que se localizan en la superficie de las células endoteliales vasculares y de las células madre hematopoyéticas (HSCs), y de forma soluble en la circulación sanguínea^{141, 308, 311}. El VEGFR1 promueve, además, la generación de proteasas como la MMP-9, necesarias para degradar la membrana basal de los vasos en las primeras etapas de la angiogénesis.

Responde a estímulos diversos como isquemia/hipoxia (HIF-1), otros factores de crecimiento (EGF, TGF- α , TGF- β , KGF, IGF-1, FGF, PDGF), oncogenes activados (Ras), interleuquinas (IL-1 α , IL-6), p53 mutado, estrógenos u óxido nítrico (tabla 9).

ESTÍMULOS PARA LA PRODUCCION AUTOCRINA/PARACRINA DE VEGF
Hipoxia
Interleuquina 1 y 6 (IL-1, IL-6)
Oncogenes activados Mutación p53
Factores de crecimiento (IGF, EGF, TGF-b)
Radicales libres de O ₂ Óxido nítrico
Productos avanzados de glicosilación (AGEs)
Metales de transición
Estrógenos

Tabla 9: Estímulos para la producción de VEGF

Como respuesta se incrementa la expresión del VEGF y se produce una inducción de la proliferación de EPCs (producción, diferenciación y migración) y de otros tipos celulares no endoteliales^{309, 312}. La movilización y la incorporación de EPCs a zonas de neovascularización han sido comprobadas en diferentes estudios³¹³⁻³¹⁵.

Además de promover la angiogénesis y la vasculogénesis, el VEGF también está implicado en la inhibición de la apoptosis, la promoción de la migración celular, el incremento de la conductividad hidráulica de microvasos aislados y, con la colaboración del óxido nítrico, interviene en la vasodilatación. En condiciones normales de regulación participa en procesos como la implantación embrionaria, cambios vasculares que tienen lugar durante el ciclo ovárico y en la reparación y cicatrización tisular³¹⁶. Cuando su regulación es inadecuada puede contribuir al crecimiento tumoral al promover la angiogénesis y también se le ha implicado en la patogénesis de entidades tan diferentes como las retinopatías proliferativas, la degeneración macular asociada a la edad, la artritis reumatoide o la psoriasis¹³.

Otros efectos menos conocidos son los efectos neurotróficos y los efectos neuroprotectores (tabla 10). Se ha comprobado en estudios de experimentación animal con roedores que el VEGF expresado por las células de Purkinje, al unirse a su receptor VEGFR-2, dirige la migración de las neuronas granulares desde su localización inicial en la capa externa del córtex cerebeloso hasta su ubicación definitiva en la capa interna

granular³¹⁷. Además se ha estudiado su potencial efecto neuroprotector en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica, de epilepsia y de isquemia cerebral³¹⁸. Por ello se ha investigado su potencial terapéutico tanto favoreciendo procesos de angiogénesis en la isquemia cerebral, como intentando antagonizar sus efectos, para frenar el crecimiento tumoral³¹⁹⁻³²².

EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL VEGF
Proliferación de células progenitoras endoteliales
Permeabilidad vascular
Producción de óxido nítrico y vasodilatación
Angiogénesis y vasculogénesis
Efectos neurotróficos y neuroprotectores

Tabla 10: Efectos biológicos del VEGF

Otros estudios indican que los estrógenos podrían inducir un incremento en la producción de VEGF y que el efecto neuroprotector que se les atribuye podría deberse a la inducción de este factor de crecimiento endotelial vascular, a través de mecanismos de vasodilatación y de inhibición de la neurotransmisión, con actividad tanto en los vasos sanguíneos como en la glía. Podría existir, por tanto, un riesgo incrementado de migraña debido a la vasodilatación inducida por VEGF y a la extravasación de proteínas del plasma secundaria a dicha vasodilatación³²³. El hecho de que la terapia estrogénica pueda mejorar la migraña se podría explicar por el hecho de que los estrógenos aumentan

los niveles tanto de VEGF como de BDNF. Éste último es inductor de un potente vasoconstrictor (NPY), cuyos niveles se elevan unos días después del estímulo por el BDNF (y no de manera inmediata) y se mantendrían elevados por una estimulación estrogénica mantenida³²⁴. También ayudaría a explicar el efecto de los triptanes sobre la migraña ya que son eficaces en los períodos del ciclo menstrual (periovulación y perimenstruación) en los que el riesgo de migraña es más elevado debido a unos niveles más bajos de NYP³²⁴.

No se ha estudiado el papel del VEGF en pacientes con migraña. Se han comunicado datos de 102 pacientes con migraña (MSA y MA) y 53 controles sanos y se han analizado las diferencias entre los valores del VEGF. Encontraron una disminución de los niveles de VEGF plasmático en pacientes con MA en relación a pacientes controles. Se postuló la existencia de un defecto vascular endotelial como mecanismo patogénico en la MA³²⁵. No se observó correlación entre los niveles de VEGF y la edad de los sujetos estudiados.

1.3.3.3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES

Las células progenitoras son células primitivas oligopotenciales derivadas de la médula ósea con capacidad de proliferación, migración y diferenciación hacia diversas estirpes celulares de la etapa adulta, que sirven para reparar los daños en los distintos tejidos³²⁶.

Las EPCs son un tipo de células progenitoras (o también denominadas “células madre”) que poseen la capacidad de diferenciación hacia células del lumen de los vasos sanguíneos³²⁷. Se pueden aislar tanto en células mononucleares circulantes como en la médula ósea o el cordón umbilical. Estudios de laboratorio sugieren que estas células expresan marcadores de superficie específicos de células endoteliales y presentan numerosas “propiedades endoteliales”³²⁸.

Esta estirpe celular fue descrita por Asahara en 1997 mediante el estudio de un subtipo de células hematopoyéticas progenitoras, CD34+, que podían diferenciarse, *ex vivo*, a células del endotelio maduras y, por tanto, las denominó células progenitoras endoteliales o EPCs³²⁹. En 1998 se identificaron células progenitoras endoteliales circulantes en la sangre periférica³³⁰.

El marcador CD34+ identifica células endoteliales, y el marcador CD133+ no está presente en las que alcanzan la maduración y sí en las células progenitoras hematopoyéticas, entre las que se incluyen las EPCs. La presencia de ambos permitió la identificación en seres humanos de las EPCs³³¹. El receptor 2 para VEGF (VEGFR-2) también identifica a las células endoteliales, y está presente tanto en las formas inmaduras como en las maduras. Así pues, las células progenitoras hematopoyéticas que expresan conjuntamente CD34+, CD133+ y VEGFR-2 presentan un comportamiento típico de EPCs. También se ha comprobado posteriormente que expresan receptor 1 del FGF³³². Otros estudios han observado que la expresión de

CD34+ no es un requisito imprescindible para la identificación de EPCs³³³.

Por ello la caracterización fenotípica de las células progenitoras del endotelio aún no se conoce de manera exacta.

La mayoría de las EPCs residen en la médula ósea en asociación con las células progenitoras hematopoyéticas y estromales que colaboran en su proliferación local y migración³³⁴. Constituyen una población celular heteróloga de células derivadas de la médula ósea de estirpe no leucocitaria, con propiedades similares a los angioblastos embrionarios y con distintos estadios madurativos: desde fenotipos inmaduros (positivos para CD133+, no presente después de la diferenciación) a otros más maduros (positivos para CD34+)³³⁵.

Las principales funciones de las células progenitoras endoteliales son la neovascularización y la reendotelización, procesos claves para el mantenimiento de la integridad endotelial. El número de colonias de EPCs refleja sus propiedades funcionales y su capacidad proliferativa³³⁵.

Las células endoteliales constituyen el reservorio para el reemplazo del endotelio disfuncionante³³⁶⁻³³⁸. Los mecanismos que condicionan un desprendimiento de EPCs al interior de los vasos son complejos y variados e incluyen daño mecánico, factores de riesgo de aterosclerosis, alteración de las moléculas de adhesión, anclaje defectuoso a las proteínas de matriz y apoptosis celular³³⁹⁻³⁴⁰.

Las EPCs también son claves en procesos de neovascularización. Esta neovascularización, en adultos, implica procesos tanto de angiogénesis (que precisa de la proliferación y migración de células endoteliales desde vasos adyacentes), como de vasculogénesis (movilización de EPCs desde la médula, a través de la circulación sanguínea, hacia los lugares donde es precisa la formación de nuevos vasos) (figura 16)³⁴¹⁻³⁴². Su papel incluye una acción paracrina simultánea favoreciendo procesos de angiogénesis. El VEGF también es un factor clave para la incorporación de EPCs a las áreas de neovascularización³¹⁴. Su administración exógena incrementa el número de células progenitoras endoteliales circulantes, por lo que se podría sugerir que su sobreexpresión induciría una mayor movilización de EPCs. Tras una lesión vascular se produce un incremento en la expresión del VEGF, con un aumento de sus niveles plasmáticos, que favorece el reclutamiento de EPCs³³⁷. Otros factores implicados en su movilización son la liberación de citoquinas, la isquemia tisular o el traumatismo vascular.

Estas acciones implican, por un lado, mecanismos de reparación y recuperación avalados por estudios en modelos animales de isquemia miocárdica: tras la administración de EPCs se incrementa la neovascularización y la recuperación funcional de los tejidos afectados³⁴³. Por otro, la angiogénesis puede no ser beneficiosa y sí constituir el lecho vascular que permite la proliferación de tumores³¹³. Un bloqueo selectivo en la migración de EPCs en estos pacientes podría constituir una estrategia terapéutica novedosa en procesos cancerígenos³⁴⁴.

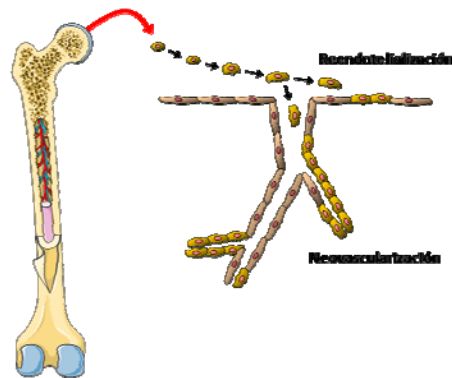


Figura 16: Fenómenos de reendotelización y neovascularización realizados por las EPCs

El daño endotelial representa el resultado final de un desequilibrio entre la magnitud del daño inicial y la capacidad de reparación del tejido. Los factores de riesgo vascular inducen la aparición de daño endotelial y en su reparación participan las células progenitoras endoteliales. Las EPCs median procesos de angiogénesis y su potencial efecto terapéutico para revascularizar el tejido endotelial dañado tras procesos de isquemia ha impulsado su estudio en los últimos años³⁴⁵.

Se ha comprobado en estudios de experimentación animal que, al inyectar células endoteliales en modelos animales de isquemia, éstas se incorporan rápidamente a los lugares donde están teniendo lugar los procesos de neovascularización^{329, 346}.

Por otra parte, también se ha estudiado la relación entre la cantidad de colonias de EPCs y la función endotelial y el riesgo vascular. En

relación con el riesgo vascular, se ha evidenciado una correlación inversa entre la puntuación en la escala de Framingham y las EPCs³²⁸. Los pacientes fumadores, con diabetes, edad avanzada o hipercolesterolemia presentan un menor recuento de EPCs que sujetos controles³⁴⁷⁻³⁴⁹. En estudios prospectivos se ha observado un aumento de riesgo de patología vascular en los pacientes con cifras bajas de EPCs³²⁹. Analizando la función endotelial (medida por la hiperemia reactiva de la arteria braquial tras isquemia) se ha encontrado una fuerte correlación inversa entre la capacidad de vasodilatación y el recuento de EPCs, independientemente de la presencia o no de otros factores de riesgo vascular³²⁸. Los sujetos con un riesgo vascular bajo presentan un menor porcentaje de EPCs envejecidas que los pacientes de alto riesgo vascular³²⁸. No queda claro si los factores de riesgo vascular disminuyen hasta agotar las reservas de EPCs o si, por el contrario, se inactiva su liberación por parte de estos factores, ya que se ha visto que pacientes con enfermedad coronaria pueden mantener unas cifras normales de EPCs tras administración de factores estimulantes de colonias de granulocitos o estatinas³⁵⁰⁻³⁵¹.

Por todo ello podríamos concluir que la aparición de un daño endotelial en ausencia de suficientes EPCs podría condicionar la progresión de la propia enfermedad cardiovascular³²⁸.

Pacientes con enfermedad cardiovascular o ictus isquémico tienen un nivel de EPCs más bajo que sujetos sanos. Esto sugiere que la aterosclerosis se asocia a una pérdida de la capacidad reparadora del

endotelio³⁵²⁻³⁵⁵. Se postulan mecanismos de estrés oxidativo o cambios en la actividad del NO modulados por los factores de riesgo vascular como los responsables de la variación de la movilización o la vida media de las EPCs³²⁸. De manera consistente se ha observado que el tratamiento con estatinas incrementa los niveles, la movilización y la funcionalidad de EPCs^{351, 356}.

En pacientes con patología cerebrovascular se ha comprobado un descenso en las EPCs en relación a controles sanos³⁵⁵. También se ha constatado unacorrelación entre la presencia de EPCs en tejidos dañados tras un infarto cerebral y su relación con un mejor pronóstico y un menor tamaño del infarto, lo que sugiere la mediación de las EPCs en procesos de neurorreparación³⁵⁷.

Estudios en animales de experimentación han relacionado las bajas reservas de células endoteliales con procesos de envejecimiento por lo que la disminución de EPCs en pacientes con riesgo vascular podría ser un factor clave en la patogénesis de la enfermedad vascular³⁵⁸⁻³⁵⁹.

Por su potencial angiogénico, la investigación sobre EPCs se ha centrado en los mecanismos de isquemia y su reparación, tanto en patología cardiovascular como cerebrovascular. Sin embargo, otras patologías podrían beneficiarse de un mayor conocimiento de las funciones y mecanismos reparadores de las EPCs.

El papel de la migraña en el incremento del riesgo vasculares un tema controvertido, especialmente para la migraña con aura. Hay estudios que muestran un riesgo significativamente mayor de desarrollar ictus isquémico en los pacientes migrañosos y este riesgo parece mayor en los pacientes con migraña con aura que en los que padecen migraña común³⁶⁰⁻³⁶³. Este riesgo incrementado también se ha constatado en patología cardiovascular y en otras entidades (CADASIL, Raynaud, angina coronaria o foramen oval permeable)³⁶⁴⁻³⁶⁵. Un recuento bajo de EPCs podría relacionarse con un incremento de riesgo vascular en los pacientes migrañosos.

Es posible que péptidos vasoactivos, protrombóticos y proinflamatorios que se liberan durante las crisis de migraña puedan lesionar al endotelio vascular, conllevando un riesgo incrementado de aterosclerosis y patología vascular²⁵⁵. Los estudios que han tratado de establecer la presencia de disfunción endotelial en la migraña basándose en métodos ultrasonográficos han resultado contradictorios^{110, 248, 251, 366}. Existe un único trabajo que explora el papel de las EPCs en la migraña. Describe el nivel y función de las EPCs en sujetos con migraña sin aura (n=67) y sujetos con migraña con aura (n=25), comparándolos con sujetos con cefalea tensional (n=74) y con controles sanos (n=37). Los niveles de EPCs resultaron menores en pacientes con migraña (y en mayor medida en pacientes con migraña con aura) al compararlos con los pacientes con cefalea tensional, y la diferencia era aún mayor en relación con los sujetos control²⁷⁰. Con respecto a su función, las EPCs de los pacientes migrañosos

tenían una menor capacidad migratoria y estaban más envejecidas, de forma similar a lo que ocurre en pacientes con patología vascular, por lo que los autores postularon que las EPCs podrían constituir un marcador de disfunción endotelial en la migraña. Los mecanismos que podrían llevar a esta situación son diversos (activación de genes implicados en procesos inflamatorios, liberación de citoquinas o activación de metaloproteinasas entre otros, apoyados por el hecho de que en otras patologías inflamatorias crónicas también se evidencian niveles bajos de EPCs circulantes)³⁶⁷⁻³⁷⁰. Este estudio no aclara si un número bajo de EPCs conduce a la migraña, si la migraña afecta negativamente a la función endotelial o si estamos ante pacientes con asociación concomitante de ambas patologías. Como punto débil del estudio de *Lee y cols.* destaca la ausencia de correlación de estos hallazgos con otros marcadores conocidos (ultrasonográficos o moleculares) de disfunción endotelial. Tampoco hay estudios posteriores que validaran estos hallazgos.

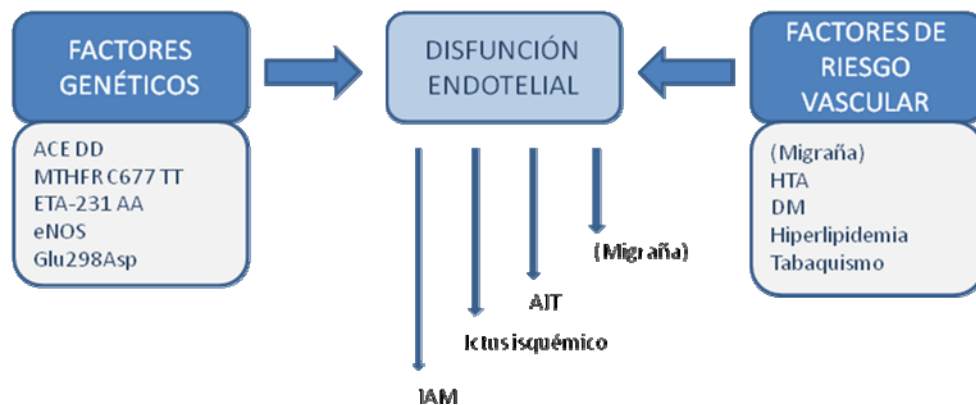


Figura 17: Interrelación entre migraña y función endotelial

Existen, por lo tanto, evidencias que sugieren que la migraña afecta a la circulación cerebral y sistémica. Si la disfunción endotelial es la causa o la consecuencia de ataques de migraña repetidos tendrá que dilucidarse en futuros estudios. Los factores de riesgos vasculares y, probablemente, la migraña, provocan una disfunción endotelial al incrementar el estrés oxidativo. La disfunción endotelial es un síndrome clínico que se asocia y predice un mayor riesgo para patología isquémica (y posiblemente MA al atribuirse recientemente a factores vasculares la posibilidad de generar depresión cortical propagada). También existen polimorfismos genéticos que se asocian a la migraña y que aumentan la susceptibilidad para la aparición de DE (figura 17)³⁷¹. A pesar de los múltiples estudios que exploran las posibles implicaciones de la disfunción endotelial en los pacientes migrañosos, los resultados son contradictorios en muchas ocasiones y dificultan la elaboración de una única hipótesis que explique la relación definitiva entre migraña y función endotelial³⁷².

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La migraña es una enfermedad incapacitante con una prevalencia elevada y que puede afectar al 25% de las mujeres en edad laboral. A pesar de los diferentes tratamientos disponibles hoy en día continúa ocupando los primeros puestos entre las enfermedades más discapacitantes, tanto para el enfermo como para su familia, y condiciona un coste económico elevado, principalmente en relación con los costes indirectos que conlleva debido al absentismo laboral que condiciona.

113

Su fisiopatología tan sólo se comprende en parte y las investigaciones acerca de una implicación de la disfunción endotelial en el desencadenamiento de las crisis de migraña están cobrando cada vez más relevancia. Se ha estudiado su implicación en diferentes trabajos de investigación pero no existen proyectos que aborden el estudio de la función endotelial de una forma global y que evalúen posibles marcadores que puedan participar en los distintos mecanismos que se postulan para la aparición del dolor.

Un mayor conocimiento de su fisiopatología también podría ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas que contribuyan a un mayor control sintomático de esta patología y, por tanto, a paliar la discapacidad y los costes que representa hoy en día.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

En la migraña existe una disfunción endotelial motivada por una secreción elevada de taquininas, de neuropéptidos y de endotelina que condicionan un aumento en la producción de óxido nítrico que se debe a la activación de la enzima sintasa del óxido nítrico. Además, la vasodilatación mediada por el CGRP afecta tanto a las arteriolas como a las células endoteliales y también provoca la activación de la eNOS, que incrementa en mayor medida la producción de NO. Estos cambios se reflejarían, a su vez, en otros marcadores de disfunción endotelial (VDE, VEGF, EPCs).

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar la presencia de disfunción endotelial, mediante técnicas de vasodilatación dependiente de endotelio y determinación de biomarcadores, en pacientes con migraña durante el período intercrítico y durante las crisis de migraña.

4.2. OBJETIVO SECUNDARIO

Analizar la relación entre la función endotelial (vasodilatación dependiente de endotelio y determinación de biomarcadores) y las variables clínicas de la migraña (tiempo de evolución de la enfermedad, frecuencia de crisis, intensidad de los episodios y duración del dolor).

5. PACIENTES Y MÉTODOS

5. PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo de pacientes con migraña y controles sanos y se recogieron los datos clínicos, ultrasonográficos y niveles de biomarcadores en una base de datos diseñada específicamente para este estudio.

5.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

Para estudiar la relación entre migraña y función endotelial se seleccionaron de manera prospectiva pacientes controles y pacientes diagnosticados de migraña por un neurólogo desde las consultas de Neurología. Se definieron los criterios de inclusión y de exclusión de forma previa al inicio de la recogida de datos. Los sujetos seleccionados cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

125

5.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes diagnosticados de migraña episódica según los criterios de la IHS 2004. También se incluyeron controles sanos que no padecían migraña ni otro tipo de cefalea.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes mayores de edad (≥ 18 años)
- Pacientes pertenecientes a ambos sexos
- Pacientes con posibilidad de cumplimiento del protocolo del estudio
- Pacientes que hubiesen accedido a participar de forma voluntaria, con cumplimentación del consentimiento informado tras proporcionar la información del proyecto por escrito
- Para la realización de las determinaciones basales, los pacientes con migraña no habían presentado ninguna crisis en las 72 horas previas ni en las 24 horas posteriores al estudio, ni habían realizado consumo de medicación antiinflamatoria/analgésica durante ese período
- Para la realización de las determinaciones durante la crisis de migraña los pacientes debían acudir al hospital en el momento de presentar un ataque migrañoso, sin ingesta previa de medicación antiinflamatoria/analgésica

126

5.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se consideraron como criterios de exclusión todos aquellos antecedentes que pudieran interferir con la función endotelial:

-
- Hipertensión arterial (HTA conocida y tratada con antihipertensivos o ≥ 2 registros de TA superiores a 140/90 mmHg)
 - Enfermedad coronaria (lesiones coronarias $>50\%$ demostradas angiográficamente, infarto de miocardio documentado, angina de pecho, recanalización coronaria)
 - Diabetes mellitus (DM conocida tratada con dieta, fármacos o ambas; glucosa sérica en ayunas mayor de 126 mg/dl en ≥ 2 determinaciones)
 - Hipercolesterolemia (colesterol plasmático en ayunas > 200 mg/dl o hipercolesterolemia tratada farmacológicamente)
 - Enfermedades infecciosas presentes en el momento del estudio
 - Enfermedades inflamatorias de curso crónico
 - Enfermedad sistémica grave
 - Oligomenorrea, polimenorrea u ovario poliquístico
 - Obesidad (índice de masa corporal > 35 kg/m²)
 - Fumadores activos (en el momento del estudio o en los 12 meses previos)
 - Consumo reciente de drogas vasoactivas (para la realización del estudio, en caso de consumo, debió pasar al menos un tiempo superior a 4 veces la vida media del fármaco)

5.2. DESCRIPCIÓN DE PARAMETROS

5.2.1. VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS

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

Edad y sexo

Se incluyeron pacientes varones y mujeres. La edad se estableció en años.

128

Antecedentes familiares de migraña

Se investigó la existencia de antecedentes familiares de migraña tanto en sujetos controles como en pacientes migrañosos.

5.2.2. VARIABLES CLÍNICAS

Los datos clínicos de esta serie se obtuvieron mediante entrevista clínica a pacientes migrañosos. Se incluyeron el tipo de migraña, la frecuencia de las crisis, la intensidad de la cefalea, la duración de las crisis y el tiempo de evolución de la enfermedad. También se recogió el tratamiento que recibían los pacientes en el momento del estudio.

Tipo de migraña

Los sujetos con migraña se clasificaron en dos grupos de acuerdo a los criterios establecidos por la IHS en 2004: pacientes con migraña sin aura (o migraña común) y pacientes con migraña con aura (o migraña clásica).

Frecuencia de crisis de migraña

Se determinó mediante el número de días de dolor que cada paciente presentaba al mes. Se establecieron 3 categorías:

- Pacientes con cefalea < 4 días al mes
- Pacientes con cefalea entre 4 y 7 días al mes
- Pacientes con cefalea entre 8 y 15 días al mes

129

Los pacientes con cefalea más de 15 días al mes cumplirían criterios para migraña crónica (no episódica) y, por tanto, no fueron incluidos en el estudio.

Intensidad de la cefalea

Se establecieron 3 categorías para la intensidad de la cefalea:

- Ligera
- Moderada
- Intensa

Duración de las crisis de migraña

Se establecieron 3 categorías para clasificar a las migrañas del estudio en función de su duración:

- Dolor presente durante 4-8 horas
- Dolor presente durante 9-24 horas
- Dolor presente durante > 24 horas

130

Tiempo de evolución de la migraña

Se determinó en años, desde el inicio de la clínica hasta la inclusión en el estudio.

Tratamiento

Se investigó a cerca del uso preferente de los tratamientos sintomáticos (AINEs, triptanes o ergóticos), y de la necesidad de consumo de medicación antiemética.

Se preguntó acerca del empleo concomitante de tratamiento preventivo para las crisis de migraña (betabloqueantes, antagonistas del calcio, antidepresivos tricíclicos o neuromoduladores).

5.2.3. VARIABLES ULTRASONOGRÁFICAS

Se realizó un estudio ultrasonográfico a todos los pacientes (casos y controles). Incluía la visualización de los troncos supraaórticos (para determinar el índice íntima-media y establecer la presencia de placas de ateroma) y la determinación de la vasodilatación dependiente de endotelio. Para ello se empleó un ecodoppler color de alta definición Aplio 70 con un transductor de 7'5 Hz.

131

De forma previa a la inclusión de pacientes en el estudio se realizaron las mismas determinaciones en 5 sujetos casos para entrenamiento técnico y validación de los datos, comparándolos con los resultados obtenidos por personal facultativo del Servicio de Neurología entrenado en la técnica(consultas de neurosonología).

Índice íntima-media

El estudio se realizó de forma basal en pacientes con migraña y en sujetos controles. Se empleó el doppler en modo B.

Para determinar el IMT se localiza (mediante la sonda del doppler) la arteria carótida común en la región cervical en sentido longitudinal, por debajo y por detrás de la glándula tiroides. Se desciende a lo largo del vaso hasta contactar con la clavícula y posteriormente se asciende hasta la altura del ángulo mandibular. A lo largo del recorrido se estudia el tamaño del complejo íntima-media y la presencia o ausencia de placas de ateroma. La parte final de la carótida común se ensancha en la región denominada bulbo carotídeo y se bifurca en dos ramas: la arteria carótida externa y la arteria carótida interna. El grosor de la capa íntima se mide en el tercio proximal de la arteria carótida común, a una distancia de 1 cm por debajo del bulbo carotídeo, en la pared posterior del vaso. Para ello se realizan tres determinaciones del grosor de la capa íntima y se obtiene la media de las tres. Según su valor se distingue entre un grosor normal, engrosamiento íntima difuso o placa de ateroma (tabla 11).

132

GROSOR INTIMA-MEDIA	CLASIFICACION
0-0.9 mm	Normal
1.0-1.5 mm	Engrosamiento íntima
>1.5 mm	Placa de ateroma

Tabla 11: Clasificación del IMT en función de su grosor

Vasodilatación dependiente de endotelio

El estudio se realizó a sujetos controles y a pacientes migrañosos, durante el período intercrítico y en la crisis de cefalea.

Se empleó el dúplex (ecografía en modo B de forma conjunta con el sistema de doppler pulsado) en modo *dinamic flow*, técnica que permite un estudio del flujo interior de la arteria con una mejor definición.

Los pacientes permanecieron en decúbito supino durante los diez minutos previos a la realización de la prueba. Se obtuvo la imagen de la arteria braquial entre 3 cm y 5 cm por encima de la fosa antecubital del brazo dominante en una proyección longitudinal. La temperatura de la habitación donde se realizó el estudio ultrasonográfico era similar a la temperatura de la habitación donde se encontraba el paciente previamente y permanecía estable a lo largo de las diferentes determinaciones realizadas a los distintos sujetos del estudio.

Primero se realizaron las mediciones del diámetro de la arteria braquial en condiciones basales. Una vez obtenida la imagen arterial con una visualización óptima, se marcaba la ubicación del transductor y se procedía a insuflar el esfigomanómetro en el tercio proximal del antebrazo hasta alcanzar una presión de 300 mmHg, manteniéndose a esta presión durante 4 minutos. A continuación se procedía a su liberación inmediata, provocando de esta forma una hiperemia reactiva. Se obtenían

nuevas imágenes de la arteria braquial a los 60 segundos tras la retirada del esfigmomanómetro en la localización marcada previamente, y se determinaba así el valor del diámetro arterial postoclusión (figura 18).



Figura 18: Determinación de la VDE

134

Este diámetro se calculó como la dimensión interna de la pared vascular desde la interfaz entre el lumen y la íntima entre la cara anterior y la cara posterior del vaso (figura 19).



Figura 19: Determinación del diámetro arterial (mm)

La vasodilatación dependiente del endotelio se calculó mediante la fórmula

VDE =, expresada en porcentaje (%),

$$\left(\frac{D2-D1}{D1}\right) \times 100$$

donde D1 es la media de los diámetros de la arteria en sístole en condiciones basales (5 mediciones) y D2 es la media de los diámetros en sístole tras la liberación de la oclusión (5 mediciones). Representa, por tanto, el porcentaje de cambio del diámetro del vaso tras la compresión y posterior dilatación con respecto a su diámetro basal.

5.2.4. VARIABLES MOLECULARES

En este estudio se han determinado, entre los diferentes marcadores moleculares relacionados con la función endotelial, el CGRP por su implicación en la fisiopatología de la migraña, NOx por su implicación directa en el funcionamiento del endotelio y mecanismos de vasodilatación y el VEGF por su relación tanto con las EPCs para la mediación de procesos de reparación como en la vasodilatación en colaboración con el NO.

135

Se realizaron extracciones sanguíneas a todos los sujetos con migraña en el momento basal (intercrisis) y a todos los sujetos controles. A los pacientes con migraña se les realizó una nueva extracción durante la crisis de migraña. Se recogió el tiempo transcurrido (en horas) entre el inicio de la crisis y la extracción sanguínea.

La muestra de sangre se obtuvo de la vena cubital del brazo no dominante (el contrario al empleado durante el estudio ultrasonográfico) y de forma previa a la aplicación de la isquemia para determinar la VDE.

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

Cada extracción constó de 1 tubo de 4.5 ml de bioquímica con separador para la obtención de suero. Se dejaron reposar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente para la formación del botón celular, y luego se centrifugaron a 3.000 rpm durante otros 10 minutos. El suero se repartió en 2 alícuotas de 1 ml. Se congelaron a - 80°C hasta la realización de los test moleculares oportunos.

136

Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones moleculares:

- Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)
- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
- Metabolitos estables del óxido nítrico (NO_x)

CGRP:

Los niveles séricos de CGRP se determinaron mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), obtenidos de Peninsula Labs, LLC (Belmont, CA, USA).

El coeficiente de variación intraensayo fue del 5.9 % y el coeficiente de variación interensayo, del 7.4 %.

VEGF:

Los niveles séricos de VEGF se determinaron mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), obtenidos de R&D (Minneapolis, USA).

137

El coeficiente de variación intraensayo fue del 5.1 % y el coeficiente de variación interensayo, del 6.2 %.

NO_x:

Los niveles séricos de nitratos y nitritos obtenidos de muestras de suero se desproteinizaron mediante ultrafiltración, utilizando filtros Amicon Ultra 0.5ml (Millipore) sometidos a una filtración a 12000rpm durante 30 minutos. Posteriormente los niveles de nitrato y nitrito (NO_x) presentes en las muestras fueron analizados mediante un método de HPLC adaptado de *Tsikas y cols.*³⁷³. Los tiempos de retención obtenidos para el

nitrato y nitrito fueron de 2.72 minutos y 6.53 minutos respectivamente. Para el análisis de los datos se creó una nueva variable, NO_x , definida como la suma de las concentraciones de nitrato y nitrito presente en cada muestra.

El aparato de HPLC consiste en una bomba Spectra System P4000, un autosampler Spectra System AS3000 y un diodo detector de alta sensibilidad Spectra System UV6000LP (ThermoElectron España, Madrid, España), equipado con una celda de flujo de 5 cm de luz de paso. Los datos fueron adquiridos y analizados por un ordenador utilizando el paquete de software ChromQuest[®] proporcionado por el fabricante HPLC.

138

La fase móvil consistió en una elución en gradiente de dos fases, la primera fase constituida por NaH_2PO_4 10mM y acetonitrilo al 15% y agua, ajustada a un pH 2 con ácido o-fosfórico y la segunda fase consistió en una mezcla de acetonitrilo al 15% y agua. Como fase estacionaria se empleó una columna BDS Hypersil C-18 (ThermoElectron España, Madrid, España).

El coeficiente de variación intraensayo fue del 2.3 % y el coeficiente de variación interensayo, del 3.1 %.

5.2.5. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Para cuantificar las EPCs en sangre periférica se realizó una extracción sanguínea (14 ml) a todos los sujetos controles y a los pacientes con migraña, durante el período intercrítico y durante la crisis de migraña.

Se extrajeron 2 tubos de 7 ml con EDTA K3. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente en caso de procesamiento inmediato tras la extracción, o bien en nevera a 4°C si la evaluación celular se realizó en un plazo de 2 horas tras la obtención de la muestra.

Las células mononucleadas de las muestras sanguíneas fueron aisladas usando un gradiente de densidad de Ficoll®, y 5×10^6 de estas células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos bañados con fibronectina en Endocult TM Medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Pasadas 48h, las células no adheridas fueron recolectadas y 1×10^6 cultivadas en duplicado en placas de 24 pocillos bañados con fibronectina con el mismo medio de cultivo. Las colonias fueron cuantificadas y evaluadas 3 días más tarde por el método descrito por *Hill y cols.* (figura 20)³²⁸.

Las unidades formadoras de colonias (UFC) se definen como un núcleo central de células redondeadas con células más alargadas en la periferia (figura 21).

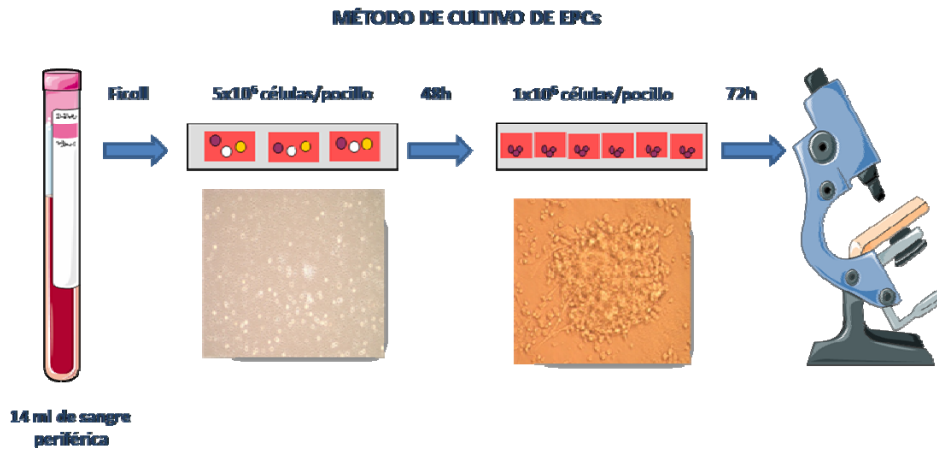


Figura 20: Método de cultivo de las EPCs

140

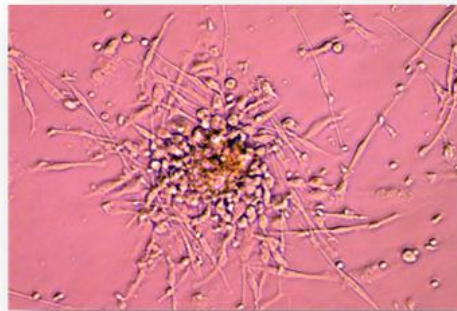


Figura 21: Microfotografía de UFC-EPC en microscopio de contraste de fases (x100)

Se confirmó la línea endotelial de las células de cultivo por técnicas de inmunohistoquímica siguiendo los métodos descritos previamente^{328-329, 355}. El coeficiente de variación intraensayo, calculado por el análisis de 2 muestras sanguíneas de un mismo paciente, fue de 0.96.

5.3. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Utilizando el EPIDAT 3.1 para el cálculo de tamaño muestral en grupos independientes (pacientes con migraña en intercrisis y sujetos control) en relación a los marcadores moleculares, precisando 2 casos por cada control y esperando una diferencia de medias de 0.82 entre casos y controles de acuerdo a hallazgos de estudios previos, se necesitarían 36 casos y 18 controles para obtener un nivel de confianza del 95% (riesgo $\alpha=0,05$) y un poder estadístico del 80% (riesgo $\beta=0,20$)⁹¹.

Utilizando el EPIDAT 3.1 para el cálculo de tamaño muestral en grupos independientes (pacientes con migraña en intercrisis y sujetos control) en relación a los marcadores ultrasonográficos, precisando 2 casos por cada control y esperando una diferencia de medias de 0.71 entre casos y controles de acuerdo a los hallazgos de estudios previos, se necesitarían 46 casos y 23 controles para obtener un nivel de confianza del 95% (riesgo $\alpha=0,05$) y un poder estadístico del 80% (riesgo $\beta=0,20$)³⁶⁶.

Utilizando el EPIDAT 3.1 para el cálculo de tamaño muestral en grupos emparejados (pacientes con migraña en intercrisis y pacientes con migraña en crisis) en relación a los marcadores moleculares y asumiendo un coeficiente de correlación de 0.8, se necesitarían 19 pacientes migrañosos con y sin crisis para obtener un nivel de confianza del 95% (riesgo $\alpha=0,05$) y un poder estadístico del 80% (riesgo $\beta=0,20$)⁹¹.

No existen estudios previos que comparen los datos de vasodilatación dependiente de endotelio antes y durante la crisis de migraña para realizar el cálculo del tamaño muestral.

Se precisaban, por tanto, 46 pacientes caso (migrañas en período intercrítico) y 23 pacientes controles para la realización del estudio, así como 19 pacientes con migraña durante la crisis de cefalea.

5.4. GRUPO CONTROL

Para el estudio de las variables ultrasonográficas y de los biomarcadores se seleccionó un grupo control de 23 sujetos sanos (entre el personal hospitalario y estudiantes de Medicina y Enfermería), formado por 22 mujeres (95.65%) y un varón (4.35%), con una edad media de 31.83 ± 11.02 años. No existían diferencias significativas para estos parámetros entre el grupo de pacientes y este grupo control: sexo ($p=0.552$) y edad ($p=0.360$).

142

5.5. MÉTODO ESTADÍSTICO

Las variables ultrasonográficas y de laboratorio tienen una distribución normal, por lo que son expresadas como medias \pm desviación estándar. La comparación entre dos grupos se realizó mediante la

aplicación del test de la t de Student. La comparación entre varios grupos de una misma población se determinó mediante el test de ANOVA.

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

El análisis de curva COR fue utilizado para establecer el punto de corte más apropiado para el número de colonias de EPCs que identifique a pacientes con diagnóstico clínico de migrañas con respecto a controles sanos.

143

Se consideró que un resultado era significativo para todos los valores de $p < 0.05$.

El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS 16.0 para Mac.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

En este estudio se han incluido 47 pacientes con migraña y 23 pacientes controles. 19 de los pacientes migrañosos también fueron estudiados durante la crisis de migraña.

Inicialmente se evaluaron 48 sujetos con migraña pero una paciente se excluyó del estudio por presentar un episodio de espasmo del carpo tras 2 minutos de aplicación de isquemia para la determinación de la vasodilatación dependiente de endotelio.

6.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

6.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

147

Estudio prospectivo realizado entre abril de 2007 y diciembre de 2009 en el Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

En el grupo de los pacientes con migraña, la edad media de los pacientes fue de 37.8 ± 10.4 años. 46 de los pacientes eran mujeres (97.87%) y 1 paciente era varón (2.13%). En los sujetos control, 22 fueron mujeres (95.65%) y 1 era varón (4.35%). La edad media fue de 31.8 ± 11.0 años.

El 51.43 % (n=36) tenía antecedentes familiares de migraña, de los que el 80.55 % eran pacientes con migraña (n=29) y 19.44 %, sujetos control (n=7).

6.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Tipo de migraña

De los pacientes con migraña (n=47), 33 pacientes presentaban migraña sin aura (70.21%) y 14 tenían episodios de migraña con aura (29.79 %).

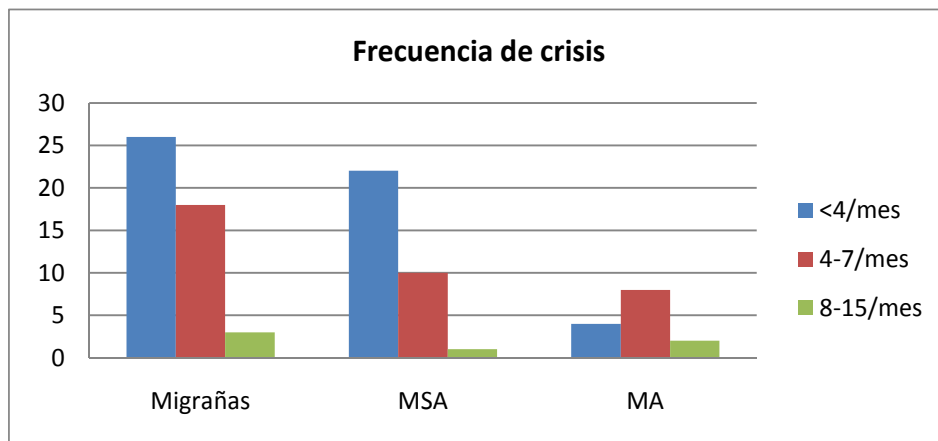
148 *Tiempo de evolución*

El tiempo medio de evolución de las migrañas fue de 16.45 ± 13.40 años. Para las MSA fue de 16.3 ± 12.9 años y para las MA, de 17.7 ± 14.6 años. No se encontraron diferencias significativas entre ambos valores ($p=0.744$).

Frecuencia de crisis

En relación a la frecuencia de días de dolor, el 55.32 % de los pacientes (n=26) presentaron <4 días de dolor/mes, el 38.30 % de los

pacientes 4-7 días de dolor/mes (n=18) y el 6.38 %,8-15 días de cefalea/mes (n=3). Para las MSA estos valores fueron de 66.67 % (n=22), 30.30% (n=10) y 3.03 % (n=1) respectivamente, y para las MA de 28.57 % (n=4), 57.14 % (n=8) y 14.29 % (n=2) (gráfica 1). Los pacientes con MA presentaban una frecuencia de crisis significativamente mayor que los que padecían MSA ($p=0.013$).

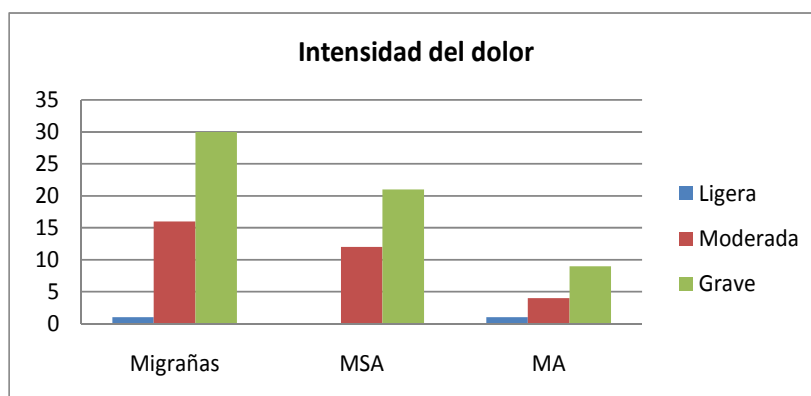


Gráfica 1: Frecuencia de días de dolor en todos los pacientes con migraña, en pacientes con migraña sin aura y en pacientes con migraña con aura

Intensidad de crisis

En relación a la intensidad de las crisis se observaron los siguientes resultados para cada una de las 3 categorías: intensidad ligera en el 2.13 % de los pacientes (n=1), intensidad moderada en el 34.04 % (n=16) e intensidad grave en el 63.83 % (n=30). En las MSA el porcentaje de

pacientes con intensidad ligera fue de 0.0 % (n=0), con intensidad moderada fue de 36.36 % (n=12) y con intensidad grave de 63.64 % (n=21). En las MA la distribución de la intensidad de la migraña fue de 7.14 % (n=1), 28.57 % (n=4) y 64.29 % (n=9) respectivamente (gráfica 2). No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con MSA y los pacientes con MA (p=0.900).

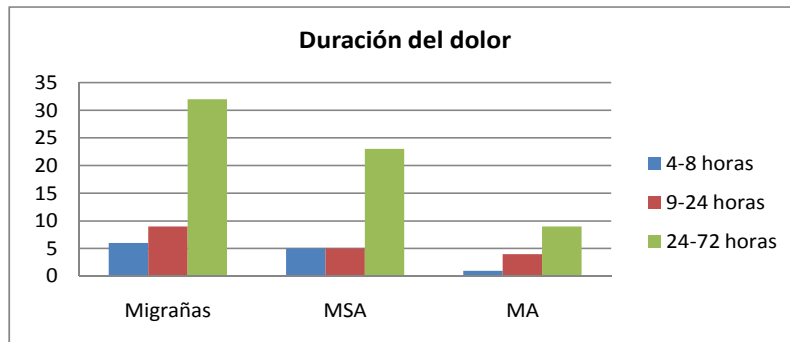


Gráfica 2: Intensidad del dolor en todos los pacientes con migraña, en pacientes con migraña sin aura y en pacientes con migraña con aura

Duración del dolor

En relación a la duración de las crisis, el 12.77 % (n=6) de las migrañas presentaban crisis de dolor de 4-8 horas de duración, el 19.15 % (n=9) padecían cefalea de 9-24 horas de duración y el 68.08 % (n=32) de los pacientes presentaban ataques de >24 horas de duración. Para las MSA estos valores fueron de 15.15 % (n=5), 15.15 % (n=5) y 69.70 % (n=23) respectivamente, y para las MA de 7.14 % (n=1), 28.57 % (n=4) y 64.29 %

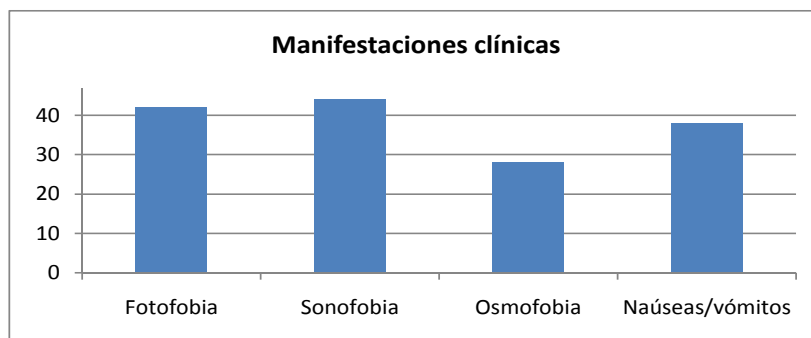
(n=9) (gráfica 3). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0.911$).



Gráfica 3: Duración del dolor en todos los pacientes con migraña, en pacientes con migraña sin aura y en pacientes con migraña con aura

Manifestaciones clínicas

Con respecto a la sintomatología clínica de las crisis de migraña, el 89.36 % (n=42) de los pacientes presentaban fotofobia, el 93.62 % (n=44) sufrían sonofobia, el 59.57 % (n=28) referían osmofobia y las náuseas y/o vómitos estaban presentes en un 80.85 % (n=38) de los pacientes (gráfica 4).



Gráfica 4: Frecuencia de aparición de las manifestaciones clínicas acompañantes a la cefalea

Tratamiento

En relación al tratamiento sintomático, de los 47 pacientes con migraña 21 pacientes consumían AINEs (44.68 %), 25 pacientes consumían triptanes (53.19%) y ninguno de ellos se trataba con ergóticos (0.0 %). Una paciente no se trataba con fármacos para el control del dolor (2.13 %). Ningún paciente consumía medicación antiemética (0.0 %). El 31.91 % (15 pacientes) recibía tratamiento preventivo para sus crisis de migraña.

152

Tiempo de evolución de la cefalea

19 pacientes con migraña fueron estudiados durante las crisis de migraña. En esos pacientes el tiempo medio transcurrido desde el inicio de

la cefalea hasta la toma de la muestra fue de 7.57 ± 1.41 horas. En las MSA (n=11) fue de 7.5 ± 6.1 horas y en las MA (n=8), de 8.0 ± 5.7 horas, sin que existieran diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.871$).

6.2. ESTUDIO ANALÍTICO

6.2.1. SUJETOS CONTROL Y PACIENTES CON MIGRAÑA EN EL PERÍODO INTERCRÍTICO

Realizamos un estudio comparativo entre los sujetos control y los pacientes con migraña en el período intercrítico tanto para los valores ultrasonográficos como para los biomarcadores.

153

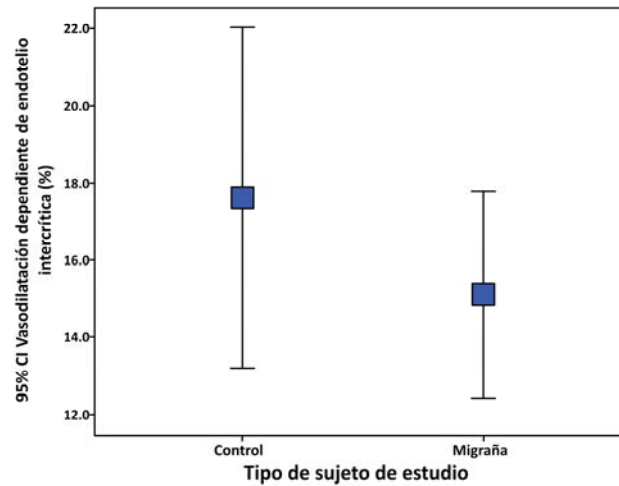
Los sujetos control presentaban una VDE de 17.5 ± 10.1 % y las migrañas de 15.3 ± 8.9 %, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores ($p=0.308$). En relación al IMT, el valor para sujetos controles fue de 0.47 ± 0.82 y para los sujetos con migraña, de 0.45 ± 0.08 ($p=0.410$) (tabla 12). No se observó la existencia de placas de ateroma en ninguno de los sujetos de la muestra.

VARIABLES	CONTROLES (n=23)	MIGRAÑAS INTERCRISIS (N=47)	p
IMT (mm)	0.47 ± 0.82	0.45 ± 0.08	0.410
VDE (%)	17.5 ± 10.1	15.3 ± 8.9	0.308
VEGF (pg/mL)	72.6 ± 56.6	473.4 ± 398.7	< 0.0001
CGRP (µg/mL)	37.1 ± 38.5	164.2 ± 139.1	< 0.0001
NOx (µM)	671.9 ± 358.6	1225.2 ± 466.1	< 0.0001
EPCs (colonias/10 ⁶ cél. cultivadas)	17.9 ± 6.0	9.4 ± 5.0	< 0.0001

Tabla 12: Estudio estadístico de variables ultrasonográficas y biomarcadores entre sujetos control y pacientes con migraña en el período intercrítico

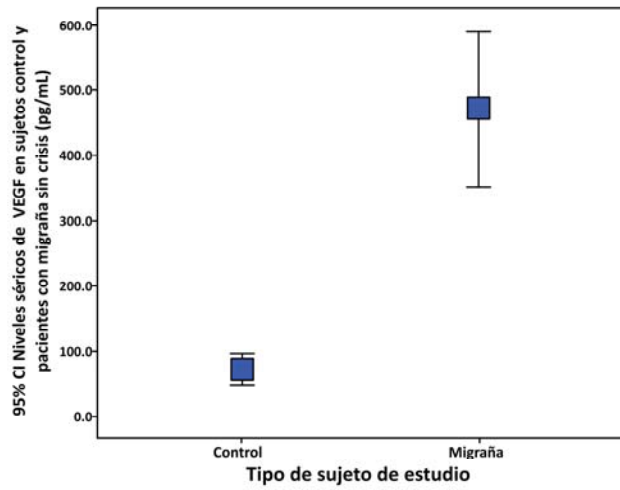
Si comparamos los resultados obtenidos entre los sujetos control y los pacientes con migraña en período basal (media ± desviación estándar) tanto para los marcadores moleculares (VEGF, CGRP y NO_x) como para las EPCs, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros analizados ($p < 0.0001$) (tabla 12).

La VDE no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Los valores de los diferentes biomarcadores analizados sí presentaron diferencias significativas entre sujetos control y pacientes con migraña (gráficas 5, 6, 7, 8 y 9).

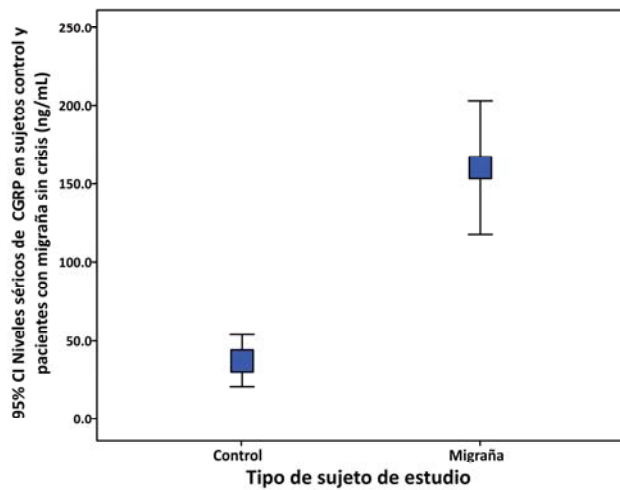


Gráfica 5: Relación entre la VDE y el grupo de estudio (sujetos control y pacientes con migraña en intercrisis)

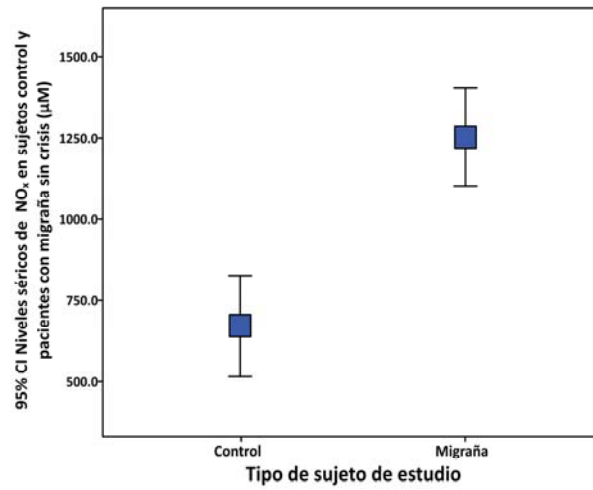
Al comparar los dos grupos de estudio (sujetos control y pacientes con migraña durante el periodo intercrítico) evidenciamos que los pacientes con migraña presentan niveles más elevados de VEGF ($p < 0.0001$), de CGRP ($p < 0.0001$) y de NO_x ($p < 0.0001$).



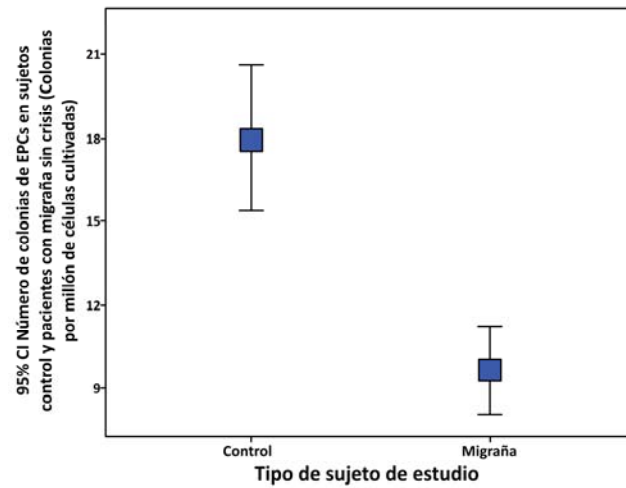
Gráfica 6: Relación entre el VEGF y el grupo de estudio (sujetos control y pacientes con migraña en intercrisis)



Gráfica 7: Relación entre el CGRP y el grupo de estudio (sujetos control y pacientes con migraña en intercrisis)



Gráfica 8: Relación entre NO_x y el grupo de estudio (sujetos control y pacientes con migraña en intercrisis)



Gráfica 9: Relación entre las UFC-EPCs y el grupo de estudio (sujetos control y pacientes con migraña en intercrisis)

La capacidad para formar colonias de EPCs está disminuida en los pacientes con migraña durante el periodo basal con respecto a sujetos controles sanos ($p < 0.0001$).

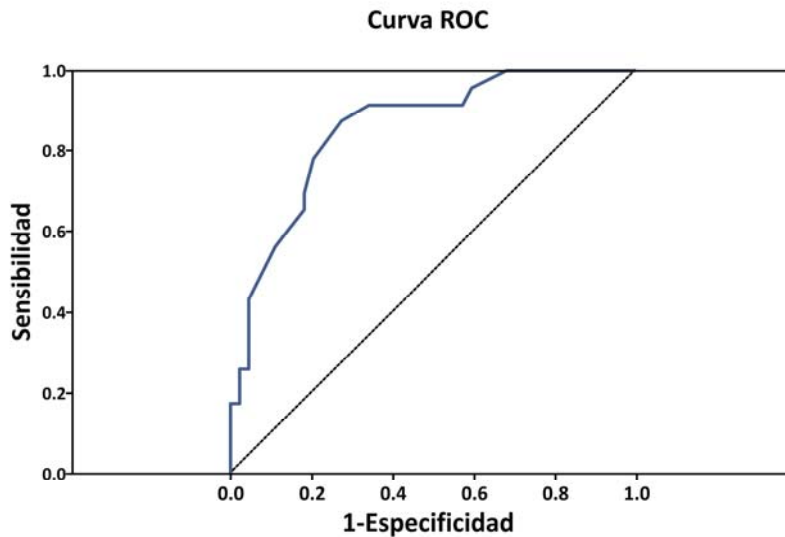
Si incluimos en un modelo de regresión logística todas las variables ultrasonográficas, moleculares y colonias de EPCs (ajustándolas por los propios valores de biomarcadores, para los que se obtuvieron diferencias significativas en el estudio univariado) observamos que todas las determinaciones moleculares y de EPCs alcanzan diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95%. El recuento de EPCs es la variable que alcanzó una mayor diferencia entre sujetos controles y pacientes con migraña (su valor fue 23 veces inferior en los pacientes que en los controles) (tabla 13).

158

VARIABLES	OR (IC 95 %)	p
VDE (%)	0.97 (0.92 - 1.02)	0.305
VEGF (pg/mL)	1.01 (1.00 - 1.03)	< 0.0001
CGRP (µg/mL)	1.01 (1.00 - 1.02)	0.002
NOx (µM)	1.00 (1.00 - 1.00)	< 0.0001
EPCs (colonias/10 ⁶ cél. cultivadas)	0.77 (0.68 - 0.88)	< 0.0001

Tabla 13: Regresión logística para VDE, marcadores moleculares y EPCs entre sujetos control y pacientes con migraña en el período intercrítico

El análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristics) muestra que un recuento de EPCs ≤ 10 colonias/ 10^6 células cultivadas es capaz de diferenciar a los pacientes con un diagnóstico clínico de migraña de los sujetos controles con una sensibilidad del 91% y con una especificidad del 73% (gráfica 10).



Gráfica 10: Curva ROC. Área bajo la curva: 0.855 (IC 95%: 0.763 - 0.947), $p < 0.0001$

6.2.2. PACIENTES CON MIGRAÑA EN EL PERÍODO INTERCRÍTICO Y PACIENTES DURANTE LA CRISIS DE MIGRAÑA

Se realizó un estudio comparativo tanto para los resultados obtenidos en las variables ultrasonográficas como para los diferentes biomarcadores (EPCs y marcadores moleculares) en el período intercrítico y durante la crisis de migraña.

Los pacientes con migraña en intercrisis presentaban una VDE (media \pm desviación estándar) de 15.3 ± 8.9 % y durante las crisis de migrañas de 18.9 ± 12.6 %, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores ($p=0.381$) (tabla 14).

VARIABLES	MIGRAÑAS INTERCRISIS (N=47)	MIGRAÑAS CRISIS (N=19)	p
VDE (%)	15.3 ± 8.9	18.9 ± 12.6	0.381
VEGF (pg/mL)	473.4 ± 398.7	457.8 ± 271.5	0.359
CGRP ($\mu\text{g/mL}$)	164.2 ± 139.1	298.2 ± 100.3	< 0.0001
NO _x (μM)	1225.2 ± 466.1	1656.8 ± 259.5	< 0.0001
EPCs (col./10 ⁶ cél.cultivadas)	9.4 ± 5.0	7.2 ± 3.2	0.022

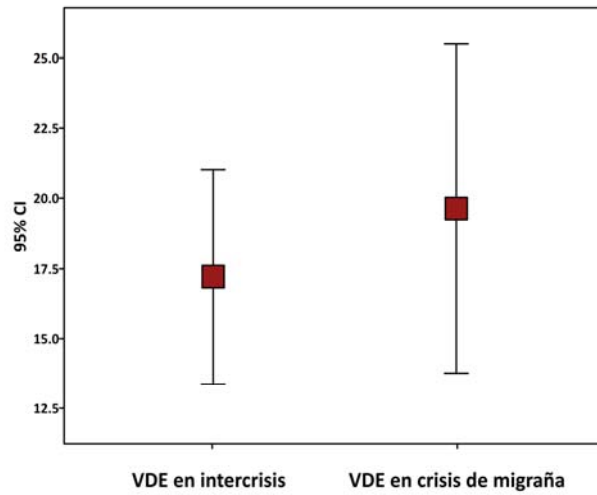
Tabla 14: Estudio estadístico de variables ultrasonográficas y biomarcadores entre pacientes con migraña en el período intercrítico y pacientes con migraña durante las crisis

160

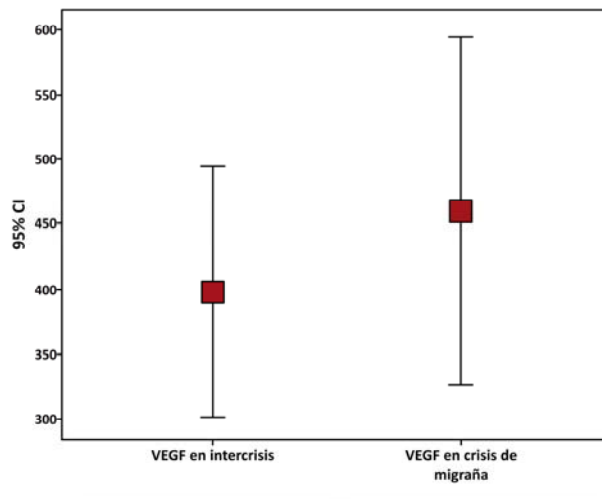
Si comparamos los resultados obtenidos entre los pacientes con migraña en período basal y los obtenidos durante la crisis de migraña para los diferentes biomarcadores, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el CGRP ($p<0.0001$), el NO_x ($p<0.0001$) y las EPCs ($p=0.022$) (tabla 14). El tiempo medio de evolución de las crisis desde su inicio hasta la realización de la VDE y la determinación de marcadores moleculares y EPCs fue de 7.57 ± 1.41 horas.

Las variables ultrasonográficas no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (gráfica 11). No se encontraron

diferencias significativas entre los valores de VEGF en intercrisis y los obtenidos durante las crisis de migraña (gráfica 12).

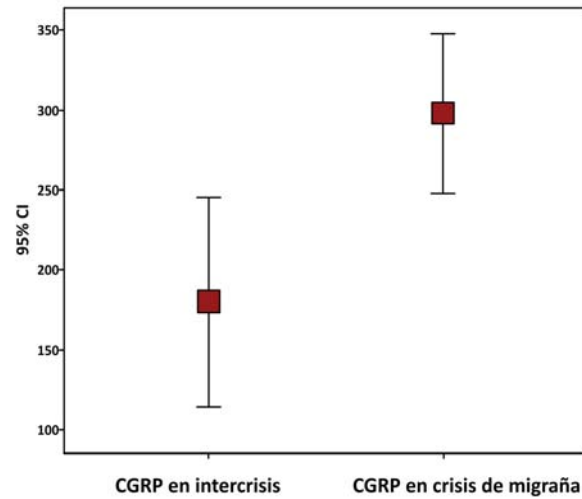


Gráfica 11: Relación entre la VDE en sujetos con migraña entre crisis y la VDE durante las crisis de migraña

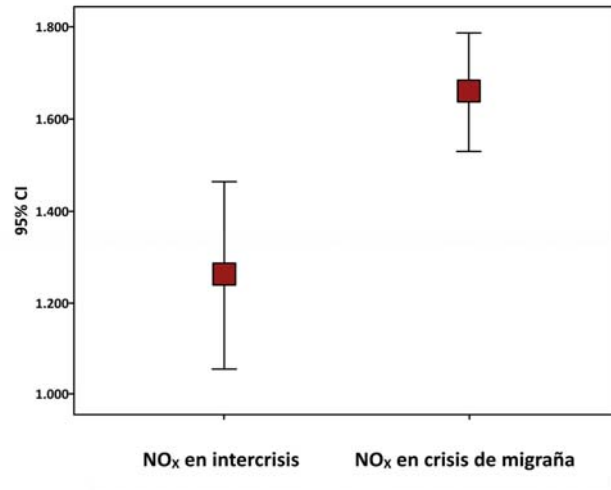


Gráfica 12: Relación entre el VEGF de los sujetos con migraña entre crisis y el VEGF durante las crisis de migraña

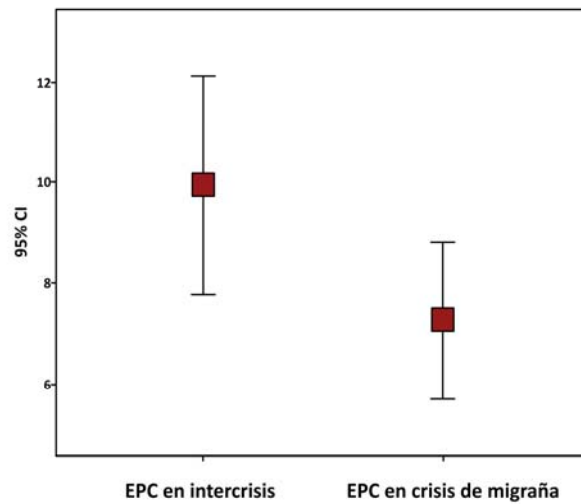
Realizando un estudio comparativo entre ambos grupos observamos cómo durante la crisis de migraña se objetivan niveles significativamente más elevados para dos de los marcadores moleculares estudiados, CGRP y NO_x , ($p < 00001$) (gráficas 13 y 14).



Gráfica 13: Relación entre el CGRP en sujetos con migraña entre crisis y el CGRP durante las crisis de migraña



Gráfica 14: Relación entre NO_x en sujetos con migraña entre crisis y NO_x durante las crisis de migraña



Gráfica 15: Relación entre las UFC-EPCs en sujetos con migraña entre crisis y las UFC-EPCs durante las crisis de migraña

Durante las crisis de migraña la capacidad para formar colonias de EPCs de los sujetos con migraña es significativamente más baja que durante el periodo intercrítico ($p < 0.0001$) (gráfica 15).

Empleando un modelo de regresión logística en el que se incluyeron los resultados de los estudios ultrasonográficos y de marcadores biológicos, para un intervalo de confianza del 95%, se observaron diferencias significativas para los valores de CGRP ($p=0.001$) y de NO_x ($p=0.004$) durante las crisis de migraña con respecto al período basal, aunque las diferencias encontradas presentaban una baja potencia estadística (tabla 15).

VARIABLES	OR (IC 95)	p
VDE (%)	1.03 (0.98 - 1.09)	0.167
VEGF (pg/mL)	1.00 (0.99 - 1.00)	0.065
CGRP ($\mu\text{g/mL}$)	1.00 (1.00 - 1.01)	0.001
NO_x (μM)	1.00 (1.00 - 1.00)	0.004
EPCs (col./ 10^6 cél. cultivadas)	0.88 (0.77 - 1.00)	0.888

Tabla 15: Regresión logística para la VDE, los marcadores moleculares y las EPCs entre pacientes con migraña en el período intercrítico y pacientes durante la crisis de migraña

6.2.3. MIGRAÑAS SIN AURA Y MIGRAÑAS CON AURA

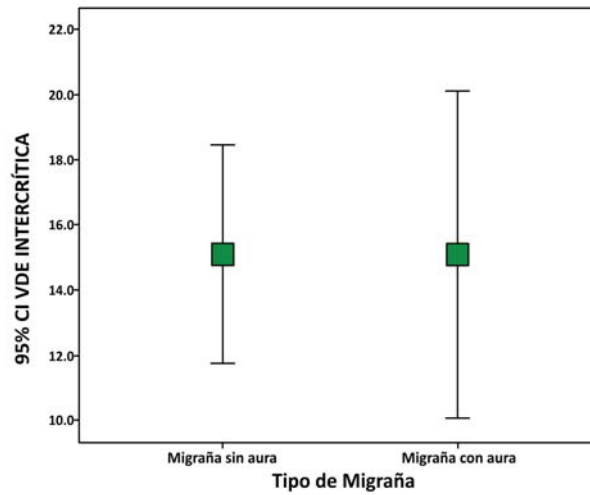
Entre los sujetos con migraña establecemos dos grupos: los pacientes que presentan migraña sin aura (n=33) y los pacientes que presentan migraña con aura (n=14).

Realizamos un estudio comparativo entre ambos grupos para las determinaciones ultrasonográficas, moleculares y de unidades formadoras de colonias de EPCs (tabla 16).

No se observaron diferencias significativas para ninguna de las determinaciones entre ambos grupos (gráficas 16,17, 18, 19 y 20).

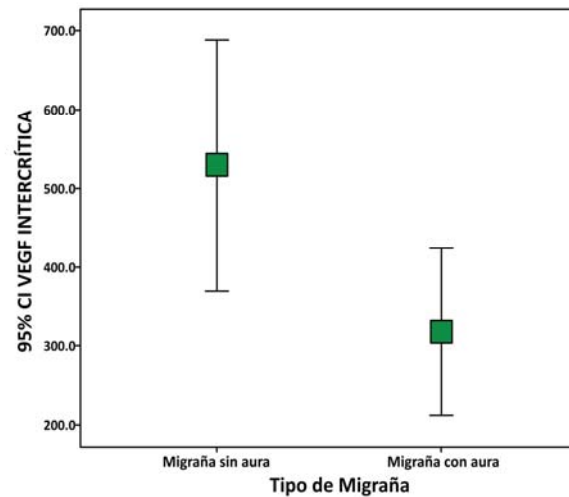
VARIABLES	MIGRAÑA SIN AURA (N=33)	MIGRAÑA CON AURA (N=24)	p
VDE (%)	15.1 ± 9.1	15.9 ± 9.0	0.996
VEGF (pg/mL)	533.2 ± 446.3	318.8 ± 165.9	0.117
CGRP (µg/mL)	151.5 ± 140.2	197.1 ± 136.6	0.295
NOx (µM)	1188.4 ± 453.8	1320.0 ± 504.2	0.589
EPCs (col./10 ⁶ cél. cultivadas)	9.1 ± 4.8	10.2 ± 5.7	0.701

Tabla 16: Estudio estadístico de variables ultrasonográficas y biomarcadores entre pacientes con migraña sin aura y pacientes con migraña con aura

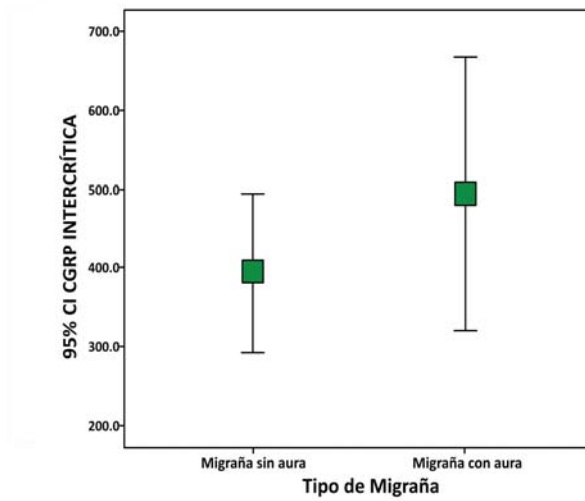


Gráfica 16: Relación entre la VDE en pacientes con migraña sin aura y la VDE en pacientes con migraña con aura

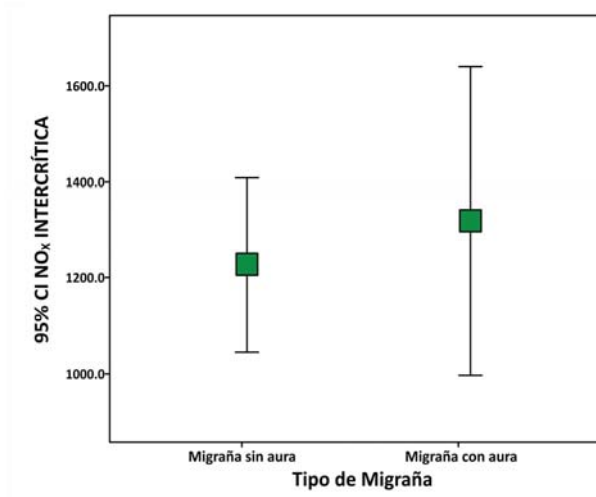
166



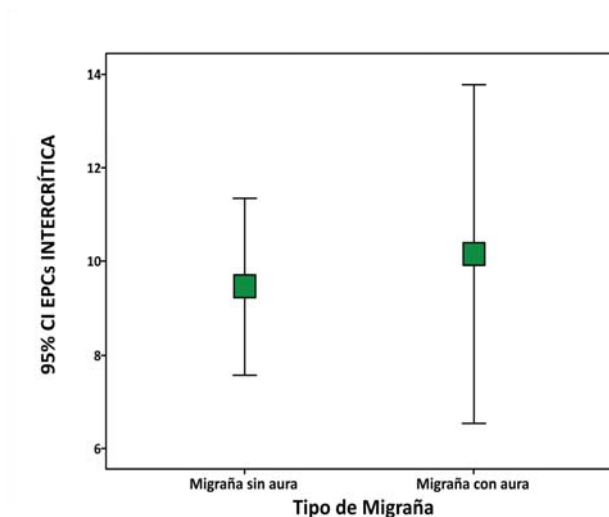
Gráfica 17: Relación entre el VEGF en pacientes con migraña sin aura y el VEGF en pacientes con migraña con aura



Gráfica 18: Relación entre el CGRP en pacientes con migraña sin aura y el CGRP en pacientes con migraña con aura



Gráfica 19: Relación entre NO_x en pacientes con migraña sin aura y NO_x en pacientes con migraña con aura



Gráfica 20: Relación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña sin aura y las UFC-EPCs en pacientes con migraña con aura

6.2.4. RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS

168

CON LA FUNCIÓN ENDOTELIAL Y LAS VARIABLES CLÍNICAS DE LA MIGRAÑA

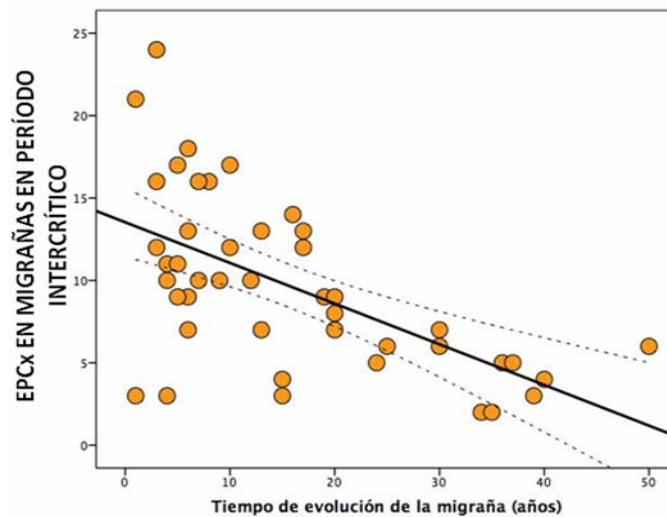
6.2.4.1. RELACIÓN CON EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA MIGRAÑA

Se estudió la relación entre el tiempo de evolución de la migraña y las variables VDE, VEGF, CGRP, NO_x y EPCs mediante el coeficiente de correlación de Pearson (tabla 17).

VARIABLES	COEFICIENTE DE PEARSON	p
VDE (%)	0.046	0.765
VEGF (pg/mL)	0.047	0.762
CGRP (μg/mL)	- 0.226	0.140
NOx (μM)	0.036	0.815
EPCs (colonias/10 ⁶ cél. cultivadas)	- 0.592	< 0.0001

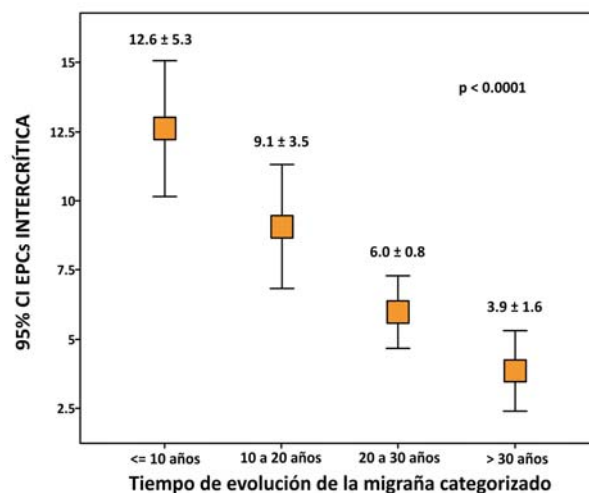
Tabla 17: Correlación entre las variables VDE, EPCs, CGRP, NO_x y VEGF y el tiempo de evolución de la migraña

Se encontró una correlación entre el número de colonias de EPCs y el tiempo de evolución de la enfermedad ($r=-0.592$; $p< 0.0001$) (gráfica 21). A mayor tiempo de evolución de la migraña (años), la capacidad de formar colonias por parte de las EPCs es menor.



Gráfica 21: Correlación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña durante el período intercrítico y el tiempo de evolución de la migraña

Para analizar detalladamente la relación entre la evolución de la migraña y el número de colonias de EPCs se categorizó la duración de la enfermedad en cuatro períodos: evolución ≤ 10 años ($n=21$ pacientes), evolución entre 10 y 20 años ($n=13$), evolución entre 20 y 30 años ($n=5$) y tiempo de evolución >30 años ($n=8$) y se observó una correlación inversa entre ambos parámetros ($p<0.0001$) para todas las categorías (gráfica 22).

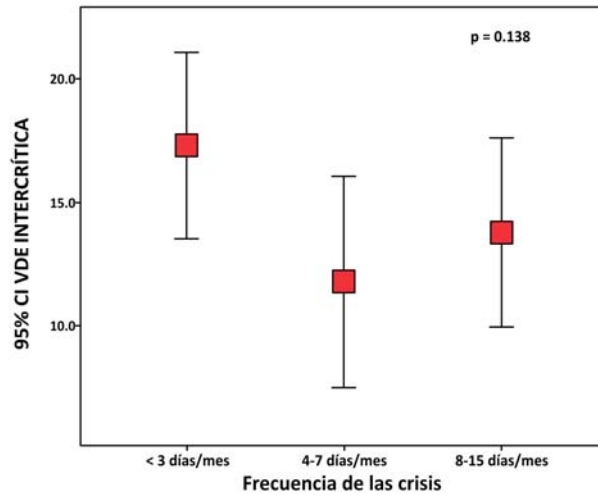


Gráfica 22: Correlación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña durante el período intercrítico y el tiempo de evolución de la migraña categorizado

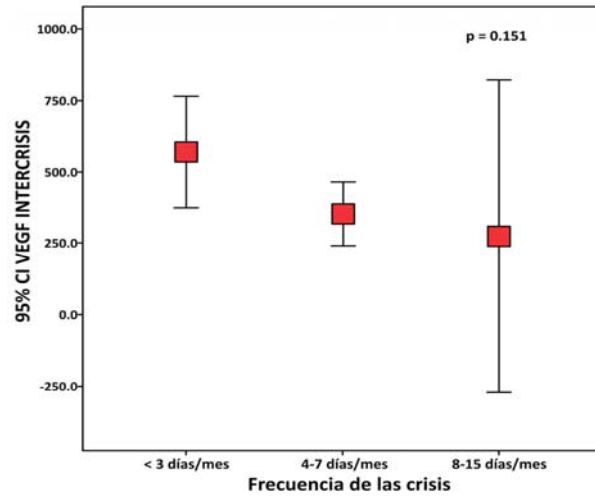
6.2.4.2. RELACIÓN CON LA FRECUENCIA DE CRISIS

Se estudió la relación entre la frecuencia de las crisis (3 o menos días de dolor/mes; entre 4 y 7 días de dolor/mes; entre 8 y 15 días de dolor/mes) y la VDE ($p=0.138$), el VEGF ($p=0.151$), el CGRP ($p=0.985$), los NO_x (0.761) y las EPCs ($p=0.767$).

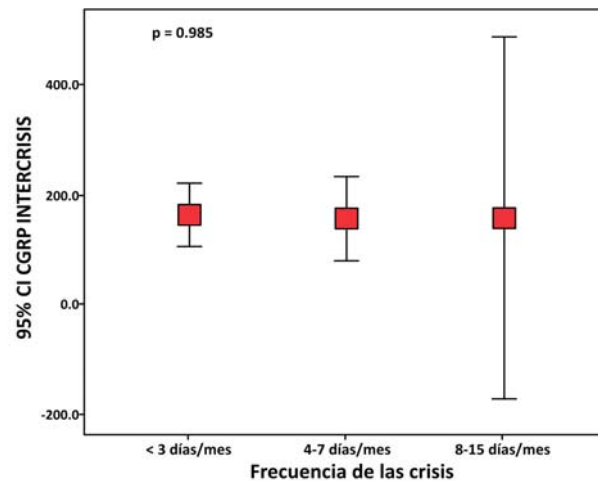
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas determinaciones y la frecuencia de episodios en los pacientes con migraña durante el periodo intercrítico (gráficas 23, 24, 25, 26 y 27).



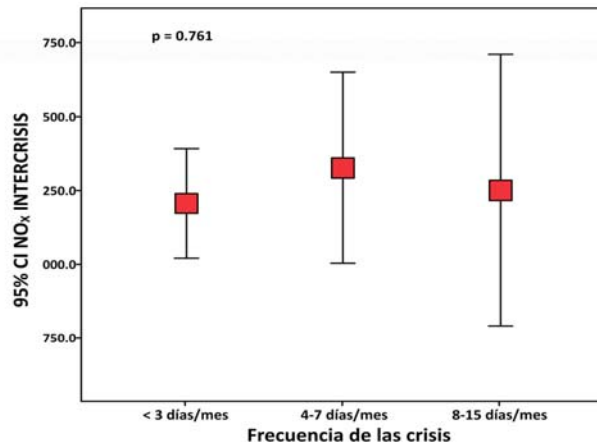
Gráfica 23: Relación entre la VDE en pacientes con migraña en el período intercrítico y la frecuencia de crisis (≤ 3 días de dolor/mes, 4-7 días de dolor/mes, 8-15 días de dolor/mes)



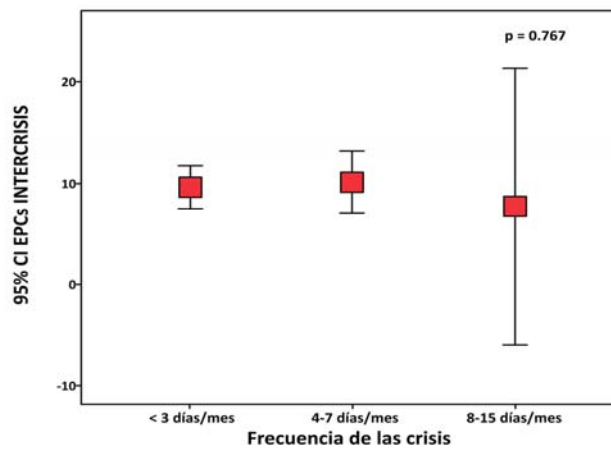
Gráfica 24: Relación entre el VEGF en pacientes con migraña en el período intercrítico y la frecuencia de crisis (≤ 3 días de dolor/mes, 4-7 días de dolor/mes, 8-15 días de dolor/mes)



Gráfica 25: Relación entre el CGRP en pacientes con migraña en el período intercrítico y la frecuencia de crisis (≤ 3 días de dolor/mes, 4-7 días de dolor/mes, 8-15 días de dolor/mes)



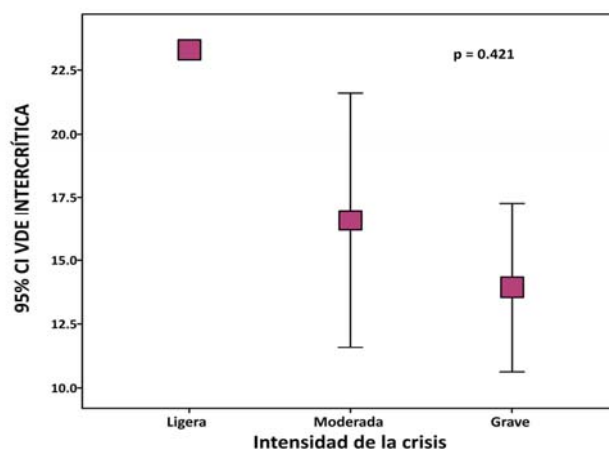
Gráfica 26: Relación entre NO_x en pacientes con migraña en el período intercrítico y la frecuencia de crisis (≤ 3 días de dolor/mes, 4-7 días de dolor/mes, 8-15 días de dolor/mes)



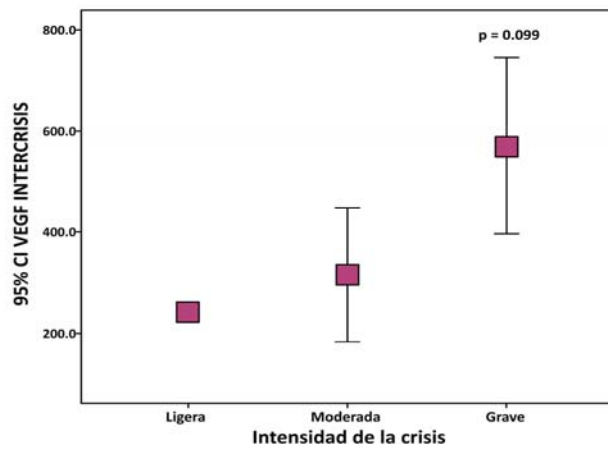
Gráfica 27: Relación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña en el período intercrítico y la frecuencia de crisis (≤ 3 días de dolor/mes, 4-7 días de dolor/mes, 8-15 días de dolor/mes)

6.2.4.3. RELACIÓN CON LA INTENSIDAD DEL DOLOR

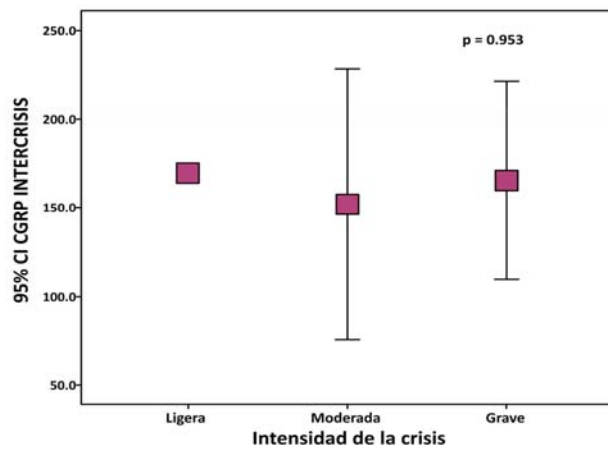
Se establecieron 3 categorías para la intensidad del dolor: ligera, moderada y grave. Se estudió la relación entre la intensidad del dolor y las variables ultrasonográficas (VDE) y biológicas (VEGF, CGRP, NO_x y EPCs) mediante el test de ANOVA. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables estudiadas: VDE ($p=0.421$), VEGF ($p=0.099$), CGRP ($p=0.953$), NO_x ($p=0.089$) y EPCs ($p=0.842$) en relación con la intensidad del dolor en los sujetos migrañosos durante el período intercrítico (gráficas 28, 29, 30, 31 y 32).



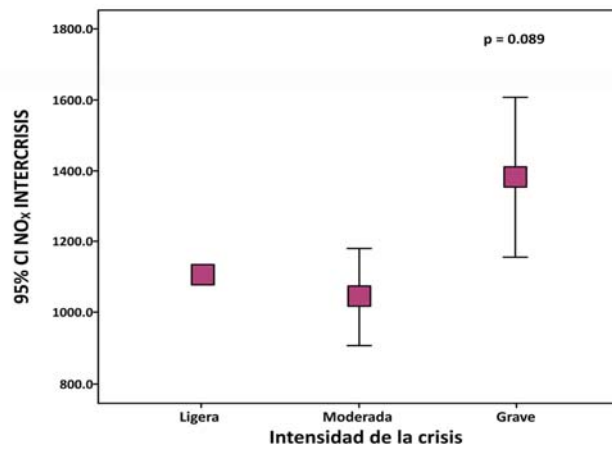
Gráfica 28: Relación entre la VDE en pacientes con migraña durante el período intercrítico e intensidad de dolor ligera, moderada o grave



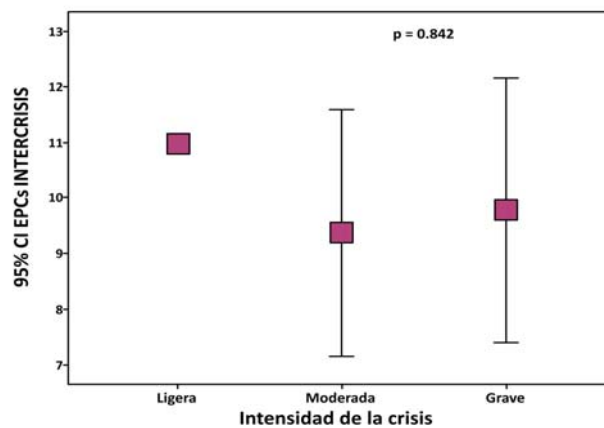
Gráfica 29: Relación entre el VEGF en pacientes con migraña durante el período intercrítico e intensidad de dolor ligera, moderada o grave



Gráfica 30: Relación entre el CGRP en pacientes con migraña durante el período intercrítico e intensidad de dolor ligera, moderada o grave



Gráfica 31: Relación entre NO_x en pacientes con migraña durante el período intercrítico e intensidad de dolor ligera, moderada o grave



Gráfica 32: Relación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña durante el período intercrítico e intensidad de dolor ligera, moderada o grave

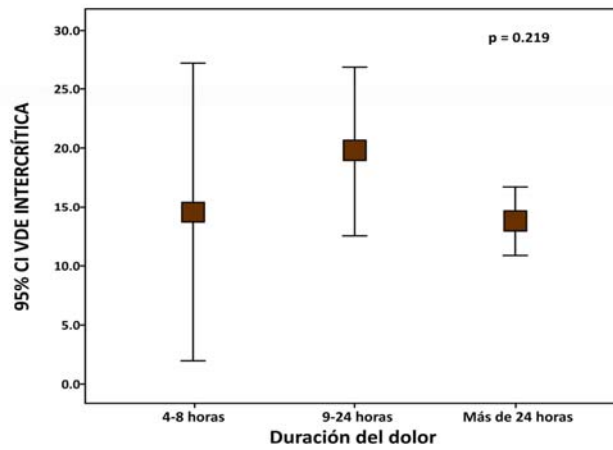
Debido al bajo número de pacientes ($n=1$) que corresponden a la categoría de intensidad ligera del dolor se estudió la relación entre las intensidades moderada y grave y las variables mencionadas previamente (VEGF, CGRP, NO_x y EPCs) mediante el test t de Student y se observaron diferencias significativas para el VEGF ($p=0.040$) y para NO_x ($p=0.003$).

Tanto el VEGF como NO_x se encontraban significativamente más elevados en los pacientes con intensidad grave del dolor en relación a aquellos sujetos con migrañas de intensidad moderada.

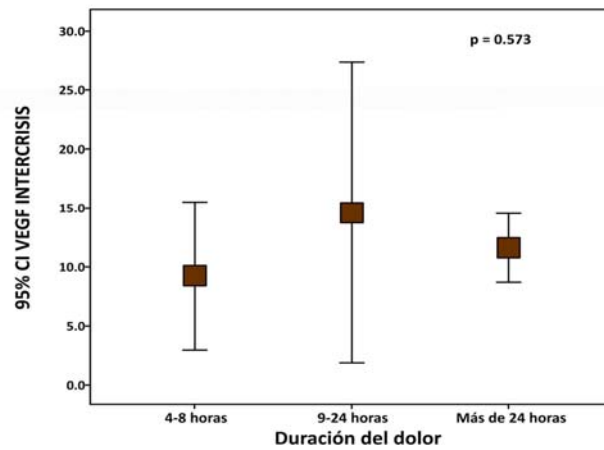
6.2.4.4. RELACIÓN CON LA DURACIÓN DE LAS CRISIS

Se analizó una posible relación entre la duración de las crisis (entre 4 y 8 horas, de 9 a 24 horas o entre 25 y 72 horas, de acuerdo con la propia definición de migraña) y los valores de la VDE y los diferentes biomarcadores.

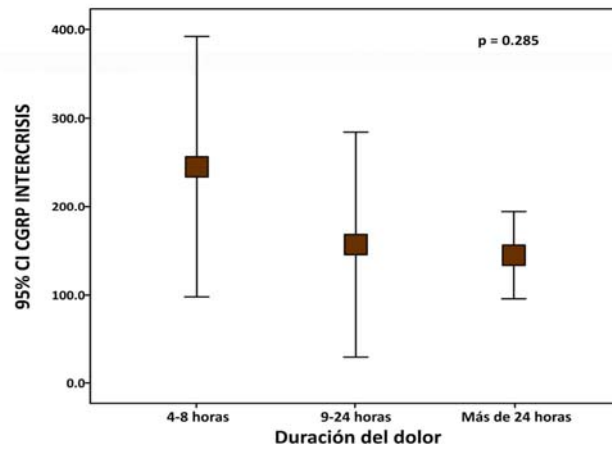
No se encontró relación estadísticamente significativa entre la duración del dolor (horas) y los valores de VDE ($p=0.219$), VEGF ($p=0.573$), CGRP ($p=0.285$), NO_x ($p=0.102$) y EPCs ($p=0.298$) durante el periodo intercrítico (gráficas 33, 34, 35, 36 y 37).



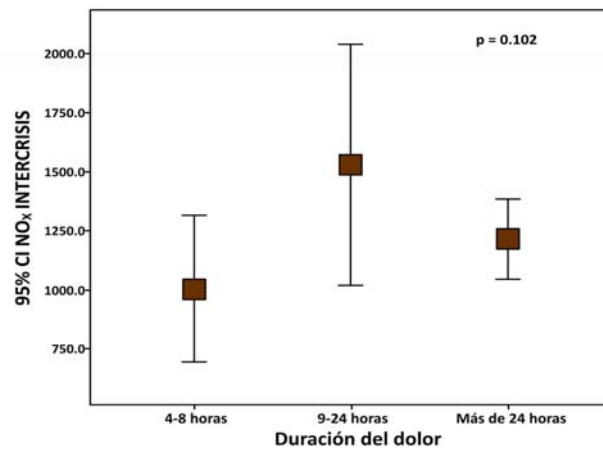
Gráfica 33: Relación entre la VDE en pacientes con migraña durante el período intercrítico y la duración del dolor



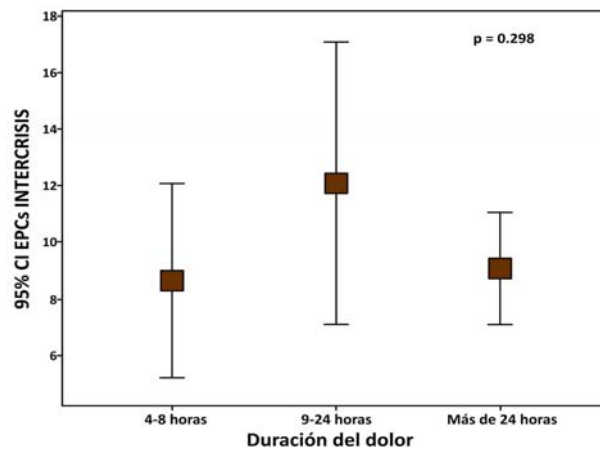
Gráfica 34: Relación entre el VEGF en pacientes con migraña durante el período intercrítico y la duración del dolor



Gráfica 35: Relación entre el CGRP en pacientes con migraña durante el período intercrítico y la duración del dolor



Gráfica 36: Relación entre NO_x en pacientes con migraña durante el período intercrítico y la duración del dolor



Gráfica 37: Relación entre las UFC-EPCs en pacientes con migraña durante el período intercrítico y la duración del dolor

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

La disfunción endotelial se define como la pérdida de la capacidad del endotelio para realizar sus funciones y, por tanto, para mantener la homeostasis vascular. La fisiopatología de la migraña sólo se conoce en parte y hoy en día se postulan tanto mecanismos vasculares como neurogénicos para intentar explicarla. La influencia de los mecanismos vasculares en los procesos de vasodilatación, de inflamación e incluso en la depresión cortical propagada hace que, en los últimos años, la investigación acerca de una posible alteración de la función endotelial en la migraña haya tomado relevancia. Sin embargo su detección no es sencilla ya que afecta principalmente a mujeres jóvenes y las alteraciones funcionales en el endotelio preceden a las alteraciones estructurales. Los resultados de este trabajo aportan nuevos datos en relación al papel del endotelio en los pacientes con migraña.

Si analizamos las características de la muestra de este estudio observamos que se trata de una población exenta de otros factores de riesgo (vasculares o no) para desarrollar una disfunción del endotelio. Además se trata de una muestra hospitalaria y la mayoría de los casos se reclutaron en una consulta especializada de cefaleas. La media de edad entre los pacientes con migraña fue de 37.8 ± 10.4 años con un tiempo medio de evolución de la enfermedad de 16.45 ± 13.40 años, suficiente para el hipotético desarrollo de una alteración en la función del endotelio

en estos pacientes. El 31.91 % recibían tratamiento preventivo, una cifra ligeramente superior a lo que se estima para la población general (25 %). Podría explicarse también por el hecho del reclutamiento en consultas específicas de cefalea y al tiempo de evolución de la enfermedad que presentan. El 70.21 % de los pacientes de nuestro estudio padecían únicamente MSA, una proporción similar a lo que sucede en la población general. El 51.43% de las personas incluidas referían antecedentes familiares de migraña, de los cuales un 80.55% correspondía a los pacientes con migraña. Esta elevada proporción de pacientes migrañosos con antecedentes familiares de migraña podría estar condicionada por la propia muestra: pacientes con migraña que precisan atención hospitalaria y sujetos control sin antecedentes de interés conocidos, no motivados para el conocimiento de enfermedades de presentación familiar. La prevalencia de la enfermedad es mayor en mujeres (el 97.87 % de los pacientes con migraña de nuestro estudio).

184

Las características clínicas de un ataque de migraña incluyen la intensidad, la duración y la frecuencia de su presentación. El 97.87 % de los sujetos con migraña presentaban una intensidad moderada o fuerte del dolor. El 68.08% de los migrañosos de este estudio refieren una duración habitual del dolor superior a 24 horas cuando no reciben tratamiento sintomático. El porcentaje con una duración entre 4-8 horas corresponde al 12.77 % de la muestra de pacientes. Los datos concuerdan con los resultados de otros estudios realizados en España⁴. En relación a la frecuencia de episodios, los resultados de este trabajo también

concuerdan con los datos publicados en la literatura³⁷⁴. Destaca el hecho que la frecuencia de episodios sea superior en las MA con respecto a los pacientes con MSA. Este hallazgo podría estar en relación, por un lado, con el hecho de que la muestra de pacientes sea una muestra hospitalaria de consulta especializada y, por otro, por el bajo número de pacientes con MA (N=14).

En este estudio se ha investigado la posible alteración de la función endotelial mediante técnicas ultrasonográficas (determinación de la vasodilatación dependiente de endotelio) y marcadores moleculares (el CGRP, como molécula fundamental en el desarrollo de mecanismos de vasodilatación e inflamación neurogénica, los metabolitos estables del NO, ya que el NO es liberado por el endotelio y participa en procesos de vasodilatación, y el VEGF, molécula que participa en la angiogénesis, en la vasodilatación y extravasación proteica, promoviendo la proliferación y liberación de EPCs). También se ha estudiado la capacidad de formar colonias por parte de las células progenitoras endoteliales, que reemplazan al endotelio disfuncionante y son precursoras de riesgo vascular.

Tradicionalmente se ha considerado que la medición de la vasodilatación del endotelio es una técnica inocua y en las diferentes series publicadas que emplean esta técnica para la evaluación de la función endotelial no se recogen efectos adversos derivados de su aplicación. En este trabajo se ha tenido que parar de forma inmediata la

aplicación de isquemia a una paciente por la aparición de un espasmo carpal a los dos minutos del inicio de la compresión, con una recuperación funcional completa posterior. La paciente no presentaba ningún factor de riesgo para el desarrollo de una tetania y los niveles de calcio en sangre fueron normales. Por lo tanto no podremos considerar en el futuro que la VDE es una técnica totalmente exenta de riesgos para los pacientes.

Analizamos primero lo que ocurre en el período intercrítico comparando a sujetos controles sin antecedentes que puedan influir en los parámetros analizados y a pacientes con migraña, sin otras patologías añadidas.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los valores de la vasodilatación dependiente de endotelio entre pacientes controles y pacientes con migraña, ni tampoco en los valores del IMT entre ambos grupos de estudio. Sin embargo los pacientes con migraña durante el período intercrítico presentaron niveles de CGRP, de NO_x y de VEGF significativamente más elevados que los sujetos del grupo control en muestras de sangre venosa periférica. El número de colonias de EPCs también era significativamente más bajo en el grupo de migrañas.

Se han realizado diversos estudios sobre la VDE en migrañas durante el período intercrítico con resultados dispares (desde estudios en los que no hay diferencias entre migrañosos y controles sanos, como el de *Silva y cols.*, a otros en los que existe una disminución de VDE en pacientes

con migraña, como aseguran *Yetkin y cols.*, o evidencias de un incremento en la VDE en migrañas con aura según *Vernieri y cols.*), por lo que las explicaciones a este fenómeno también son variadas (ausencia de cambios en la función endotelial, existencia de anomalías vasculares sistémicas en pacientes con migraña o sensibilidad incrementada al NO respectivamente)^{248, 250-251}. Los participantes en nuestro estudio, a diferencia de otros trabajos publicados, no presentaban ninguna patología o condición conocida que pudiese influir en la VDE y ésta puede ser la explicación a que todos los valores de VDE (controles, migrañas sin aura y migrañas con aura) estén por encima del valor considerado como referencia (7-10%). *Vernieri* argumenta que la capacidad de resolución del aparato empleado podría facilitar encontrar diferencias significativas en la VDE, ya que en su trabajo se empleó una sonda de mayor frecuencia (14 MHz)²⁵¹. Habrá que confirmar esta afirmación en nuevos estudios empleando sondas de mayor frecuencia.

De Hoon y cols. compararon la VDE tras una infusión intraarterial de 5-HT (estimulante de la liberación endógena de NO), donantes exógenos de NO (nitratos) y CGRP en un grupo de sujetos control y otro grupo de pacientes con migraña, y no se constataron cambios en la VDE entre ambos grupos¹¹⁰. Esto verificaría que, aunque puedan estar elevados determinados marcadores moleculares (en este caso al infundir NO y CGRP), puede no objetivarse una variación en la respuesta ultrasonográfica.

La participación del CGRP en los mecanismos fisiopatológicos de la migraña se conoce ampliamente y ha sido objeto de numerosas investigaciones en la última década. Los estudios se han realizado tanto en cultivos celulares como en modelos de DCP y de crisis de migraña en animales y también en seres humanos. Las determinaciones, en humanos, se realizaron tanto en vena yugular externa como en vena cubital sin que se objetivasen variaciones entre ambos procedimientos en estudios intrapaciente (aunque un estudio previo que empleaba controles históricos no obtenía los mismos resultados en ambas localizaciones)¹⁰⁴. En nuestro trabajo los niveles se encontraban significativamente más elevados en los sujetos con migraña durante el período intercrítico que en sujetos control. Si analizamos los resultados de trabajos que miden niveles de CGRP en sangre venosa durante el período intercrítico existe un estudio previo que avala nuestros resultados (*Ashina y cols.*)¹⁰⁵. Otro estudio anterior no había encontrado diferencias pero *Ashina y cols.* lo atribuyen a las distintas edades entre las muestras de pacientes de los dos trabajos. El primero (*Gallai y cols.*) correspondía a sujetos en edad juvenil¹⁰⁸. Los 188 pacientes con migraña de nuestro trabajo tienen una edad media de 37.8 ± 10.4 años y un tiempo medio de evolución de la migraña de 16.45 ± 13.40 años. No hemos objetivado una correlación entre el CGRP y el tiempo de evolución de la enfermedad.

Ashina y cols. descartan que los niveles elevados pudieran corresponder a CGRP liberado durante las crisis aún presente en la circulación periférica, ya que los pacientes no habían presentado cefalea

en las 72 horas previas a la inclusión, igual que sucede en nuestro caso. Otros trabajos muestran cómo los niveles de CGRP retornan a unas concentraciones basales tras 2 horas del cese de la crisis de migraña¹⁰⁸.

Los niveles elevados de CGRP en pacientes con migraña durante los periodos intercríticos podrían sugerir la existencia de una regulación vascular anormal que hace que las fibras nerviosas sensitivas liberen una mayor cantidad de CGRP que en sujetos no migrañosos.

Existen evidencias previas de niveles incrementados de NO o NO_x en pacientes con migraña durante el periodo intercrítico^{290, 292-293}. Hay otros estudios que no encuentran diferencias entre sujetos control y pacientes con migraña en estado basal (aunque sí durante las crisis de migraña)^{297-298, 301}. La VDE y la producción de NO están inexorablemente ligadas. Hay un trabajo de *Silva y cols.* en el que se estudiaron de forma basal tanto la VDE como los niveles de metabolitos del NO en sujetos controles y en pacientes con migraña en intercrisis²⁴⁸. No encontraron diferencias entre ambos grupos en ninguna de las determinaciones. El tamaño muestral era similar al de este trabajo y, aunque ambos grupos (controles y pacientes) no diferían en cuanto a las características basales, en el estudio de *Silva* sí se incluyeron sujetos con patologías que podrían influir en la función endotelial (y se ha comprobado en otras investigaciones cómo estos factores influyen negativamente tanto en la VDE como en la generación de NO por parte del endotelio). En nuestro estudio existen diferencias significativas entre sujetos control y pacientes

con migraña en intercrisis y esto podría ayudar a confirmar la hipótesis de una función endotelial alterada en los pacientes con migraña de forma persistente. Ello podría conferir una susceptibilidad mayor para presentar ataques de dolor a los pacientes migrañosos. La ausencia de correlación entre los valores de NO alterados y la VDE sugiere una mayor sensibilidad de los marcadores moleculares con respecto a los ultrasonográficos para determinar alteraciones en la función del endotelio.

Los niveles de VEGF se encuentran elevados en sujetos con migraña (MA y MSA) con respecto a sujetos control según los resultados de este trabajo. Se ha comunicado el hallazgo de niveles reducidos de VEGF en pacientes con migraña con aura en relación a controles y se postuló la existencia de una disfunción endotelial en pacientes con migraña con aura para explicar este resultado³²⁵. Al comparar lo que sucede entre las MA y las MSA en este trabajo no se han encontrado diferencias entre ambos grupos.

190

Existe una relación directa entre los niveles de VEGF y de EPCs ya que el VEGF contribuye a la proliferación y migración de las EPCs. También participa en fenómenos de vasodilatación conjuntamente con el NO. Los mismos mecanismos que podrían subyacer a la existencia de niveles más elevados de NO en sujetos con migraña con respecto a controles podrían favorecer la expresión del VEGF como manifestación de una alteración en los mecanismos de autorregulación del endotelio. Esto se podría ver potenciado por la alteración en la capacidad para formar colonias por

parte de las EPCs, que incrementaría más aún los niveles del factor de crecimiento endotelial vascular.

Las células progenitoras endoteliales también constituyen un reflejo de la función del endotelio. El único estudio realizado en pacientes con migraña durante el período intercrítico encuentra niveles significativamente menores de EPCs en sujetos con migraña que en el grupo control, lo que establecería una conexión entre migraña y la alteración de la función endotelial²⁷⁰. No sólo eso, sino que las EPCs presentaban una menor capacidad migratoria y estaban más envejecidas que las de los controles sanos. Nuestros resultados concuerdan con este hallazgo. La evidencia de una menor capacidad para la formación de colonias por parte de las EPCs extraídas del plasma de los pacientes migrañosos podría indicar una baja capacidad de regeneración del endotelio en estos pacientes. Esto podría conllevar, a largo plazo, alteraciones en la función endotelial detectables incluso por métodos diferentes a la cuantificación de biomarcadores en sangre periférica.

Estos resultados reflejan la existencia de una disfunción endotelial en los pacientes con migraña en comparación a lo que ocurre con los sujetos sin migraña. Esta disfunción se objetiva en los marcadores moleculares y en las EPCs pero no resulta perceptible mediante técnicas ultrasonográficas.

Estudios recientes afirman que la capacidad del endotelio para generar NO está conservada y lo que sucede es que existe una función alterada de las VSMCs para realizar una vasodilatación²⁵⁴. La vasodilatación alterada podría justificar el incremento de producción de NO por parte del endotelio para intentar compensar esta situación. El CGRP también actúa de forma preferente sobre las VSMCs y secundariamente sobre la célula endotelial favoreciendo la síntesis de NO. El funcionamiento anormal de las VSMCs facilitarían su actividad sobre la célula endotelial, incrementando en mayor medida la producción de NO. Esta circunstancia también podría explicar los cambios moleculares que se han relacionado con una alteración del endotelio y, al mismo tiempo, favorecer la persistencia de fenómenos que condicionan la DE. La disminución de las EPCs en los sujetos con migraña sugiere que los cambios evidenciados en los marcadores moleculares no son consecuencia de una determinación puntual en un momento concreto sino el resultado de una afectación persistente. Los niveles de VEGF constituirían el resultado tanto de las alteraciones en la capacidad de vasodilatación como del número de EPCs.

Si estudiamos lo que sucede durante la crisis de migraña y lo comparamos con los datos que conocíamos de los sujetos migrañosos durante el período intercrítico no se observan diferencias significativas en los valores de VDE entre uno y otro grupo. En cuanto a las determinaciones moleculares, salvo para el VEGF (que no mostró diferencias entre los pacientes en intercrisis y aquellos con cefalea), las

determinaciones moleculares mostraron niveles más elevados de CGRP y de NO_x en los sujetos con crisis de migraña. Las EPCs de los pacientes con cefalea presentaban una capacidad para formar colonias más baja que durante el período intercrítico.

No se han realizado previamente estudios analizando posibles cambios en la VDE durante las crisis de migraña. Los valores de la VDE en este trabajo no varían de forma significativa entre la crisis y el período basal. Los cambios que se producen durante la crisis de migraña no son perceptibles, por tanto, mediante técnicas ultrasonográficas que miden la capacidad de vasodilatación del endotelio, como ya sucedía durante el período intercrítico.

Existen diferentes trabajos que determinaron las concentraciones de CGRP durante las crisis de migraña tanto en vena yugular externa como en vena cubital. Hay evidencias de niveles más elevados de CGRP en sujetos con crisis^{99, 107}. Otro estudio posterior realizado por *Tvedskov* y *cols.* no encontró diferencias entre ambos grupos¹⁰⁴. Las poblaciones eran diferentes entre sí, ya que el estudio de *Tvedskov* no incluía a pacientes con migraña con aura y, sin embargo, en los otros dos trabajos había sujetos con ambos tipos de migraña aunque no se llegaron a objetivar diferencias en los niveles de CGRP entre ambos grupos. No obstante, los dos primeros trabajos habían incluido controles históricos para comparar con los pacientes con crisis y el estudio de *Tvedskov* basaba sus hallazgos en comparaciones intrapaciente^{99, 104, 107}.

Gallai y cols. estudiaron lo que sucedía tanto en el período intercrítico como durante los ataques de migraña, y sólo durante el dolor obtuvieron mayores niveles de CGRP que el grupo control¹⁰⁸. Ante resultados tan heterogéneos se planteó la necesidad de realizar más investigaciones para asegurar un incremento de CGRP en la migraña durante el dolor.

En este trabajo (que incluye tanto a pacientes con MSA como MA) comparamos primero lo que sucede entre sujetos sanos y pacientes con migraña en el período intercrítico, y los pacientes con migraña presentan niveles de CGRP más elevados. A continuación comparamos lo que ocurre en los sujetos con migraña en el período basal y durante el ataque de dolor, y vuelve a existir un incremento significativo en los niveles de CGRP. Estos resultados apoyan lo sugerido ya por *Goadsby y cols.* y subrayan el papel del CGRP en la fisiopatología de la migraña y en la aparición del dolor¹⁰⁷.

194

Desde los trabajos de Moncada se conoce la importancia del NO en la génesis de la migraña²⁸². Diferentes investigaciones habían constatado la existencia de una elevación de los metabolitos estables del NO en plasma durante la crisis de cefalea, tanto en estudios que comparaban los niveles durante la crisis de migraña en relación a sujetos controles sanos como aquellos que establecían como sujetos control a los propios pacientes migrañosos durante el período intercrítico^{290, 292, 297}. El único estudio que recoge unos valores de NO_xreducidos durante las crisis en

relación a los niveles de las muestras obtenidas en el período intercrítico, realiza las determinaciones en orina (en lugar de plasma) y a pacientes con un tiempo medio de evolución de sus crisis de migraña de 16 ± 12 horas²⁶¹. En ese trabajo se argumenta que la biodisponibilidad del NO durante la crisis de migraña podría estar reducida debido a una inactivación del NO provocada por los aniones superóxido que se producen como consecuencia del estrés oxidativo generado durante la cefalea. Para ello se apoyan en el hallazgo de niveles elevados de otros marcadores de estrés oxidativo que no están presentes en pacientes en intercrisis.

Nuestros pacientes presentaban un tiempo medio de evolución de la cefalea de 7.57 ± 1.41 horas (con una menor variabilidad entre los diferentes sujetos y la mitad del tiempo de evolución de la cefalea desde el inicio del ataque).

Debido a que los marcadores moleculares no permanecen estáticos durante los ataques de migraña, las diferencias entre ambos estudios podrían obedecer a su distinto perfil temporal (a medida que aumentase el tiempo de evolución de la crisis, el estrés oxidativo generado sería mayor y, por tanto, la disponibilidad de NO podría ser menor).

El hallazgo de un incremento de los valores de CGRP y de NO_x durante la crisis de migraña con respecto al período basal en este trabajo podría indicar que los mecanismos ya disfuncionantes en períodos libres de dolor se alteran aún más durante el ataque de migraña.

No existen trabajos previos que estudien los niveles de VEGF durante la crisis de migraña, y en este estudio no se objetivan diferencias significativas entre el período basal y la propia crisis. El VEGF es una molécula que participa en procesos de reparación endotelial (estimulando la proliferación y migración de EPCs) y también contribuye a la vasodilatación del endotelio conjuntamente con el óxido nítrico^{309, 314}. Tanto el hecho de que se encuentren valores significativamente más elevados de NO_x durante las crisis como que los fenómenos de vasodilatación ya se encuentran completamente desarrollados podrían contribuir a la ausencia de variación en los niveles de VEGF.

Tampoco existen estudios previos que investiguen la capacidad formadora de colonias por parte de las EPCs del plasma de los sujetos migrañosos durante una crisis de migraña. En este trabajo los niveles de UFC de EPCs están disminuidos durante el dolor con respecto al período basal. Debido a que las EPCs son indicativas de la capacidad de regeneración del endotelio, y la migraña es una enfermedad episódica en la que las crisis de migraña se suceden a lo largo del tiempo con recuperación clínica entre ellas, los cambios en la capacidad para formar colonias de las EPCs durante las crisis podrían relacionarse con la influencia de otros factores tróficos o moleculares que se expresen durante la crisis de migraña, más que con su propia capacidad de proliferación, diferenciación y migración.

Durante una crisis de migraña, el mayor incremento de CGRP y NO_x y la mayor disminución de UFC de EPCs con respecto a lo que sucede durante el período basal podría ser una expresión magnificada de la disfunción endotelial ya presente en intercrisis. La ausencia de diferencias entre los valores de VDE se explicarían por una menor capacidad de este método para detectar cambios en la función endotelial con respecto a la situación basal, en pacientes sanos (salvo por la propia migraña) sin otros factores de riesgo vascular.

Analizamos ahora la relación entre los marcadores ultrasonográficos y los biomarcadores estudiados y las características clínicas de la migraña: frecuencia de episodios, duración del dolor, intensidad o tiempo de evolución de la migraña.

No se ha constatado que exista una relación entre la frecuencia de días de dolor o la duración de las crisis con los diferentes marcadores estudiados en este trabajo. Al analizar la influencia de la intensidad del dolor se observó un incremento de los valores de VEGF y NO_x en pacientes con intensidad de dolor moderada o grave. La intensidad del dolor es la variable que podría guardar una mejor relación con el grado de activación de los mecanismos que provocan la migraña, más que la frecuencia de episodios o la duración de la cefalea. Esto explicaría la presencia de mayores niveles de marcadores moleculares en pacientes con intensidad alta de cefalea en relación a aquellos pacientes con intensidad de dolor moderado.

Se encontró una correlación entre el número de EPCs y el tiempo de evolución de la migraña que no se observó para el resto de marcadores ultrasonográficos y moleculares realizados. Cuanto mayor es el tiempo de evolución de la enfermedad, menor es el número de UFC de EPCs de los pacientes con migraña de este trabajo.

Conocemos, por investigaciones previas, que determinados marcadores indirectos de disfunción endotelial ya están alterados en migrañas de poco tiempo de evolución²⁵⁰. Con nuestro estudio se constata que la capacidad de regeneración endotelial es menor conforme la enfermedad progresa, y esta alteración no es atribuible a otras circunstancias que pudieran influir en esta capacidad de reparación, por los propios criterios de selección de la muestra, que excluyen un gran número de circunstancias que podrían afectar a la función del endotelio.

Este trabajo presenta una serie de limitaciones que hay que considerar a la hora de evaluar los resultados obtenidos.

198

La baja proporción de hombres participantes en el estudio (un sujeto control y un paciente con migraña) podría influir en alguna de las determinaciones realizadas. Aunque no se ha demostrado que ninguno de los biomarcadores estudiados en este trabajo varíe en función del sexo o de la edad, pueden existir diferencias para los valores de la VDE. El diámetro basal de la arteria es menor en mujeres por razones anatómicas y los estrógenos pueden condicionar una mejor respuesta vasodilatadora

del endotelio. Sin embargo hay que considerar que no existen diferencias significativas en relación al sexo entre ambos grupos y tampoco se objetivaron diferencias en la VDE. Los valores de la VDE de este trabajo están más elevados que en otras poblaciones y esta circunstancia (el claro predominio del sexo femenino) podría contribuir a explicar los resultados obtenidos, conjuntamente con la exclusión de pacientes con patologías que pudieran influir en la función del endotelio.

Es posible que la ausencia de diferencias entre pacientes y controles sanos en la VDE pueda estar influida por condicionantes técnicos (la frecuencia de la sonda de Doppler empleada). Estudios acompañados de la infusión de sustancias vasodilatadoras podrían ayudar a constatar si existe o no una alteración de la función endotelial que sea medible por ultrasonografía en este contexto.

Al comparar lo que sucede entre los grupos de pacientes con migraña sin aura y migraña con aura, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las determinaciones realizadas. El tamaño limitado de las muestras, especialmente para las migrañas con aura (33 pacientes con MSA y 14 pacientes con MA) podría contribuir a este resultado.

Nuestro estudio intenta analizar de forma global la función endotelial y su influencia en la fisiopatología de la migraña tanto en el período intercrítico como durante el ataque de dolor, lo que permite

diferenciar lo que ocurre, por una parte, en los pacientes con migraña por el propio hecho de ser migrañosos, y por la otra, profundizar en los conocimientos de los cambios agudos que se producen durante el ataque de dolor, estudiados en otros trabajos mediante marcadores moleculares pero no mediante métodos ultrasonográficos o estudio de colonias de EPCs. Los resultados obtenidos en los diferentes tipos de marcadores (moleculares, celulares y ultrasonográficos) permiten confirmar la hipótesis de una disfunción endotelial alterada, tanto durante la crisis de migraña como en el período basal.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con migraña existe una alteración de la función endotelial que asocia unos cambios moleculares y celulares detectables en los sujetos migrañosos durante el período intercrítico.
2. Para la evaluación de esta disfunción endotelial los marcadores biológicos son más perceptibles que las técnicas ultrasonográficas. En nuestro estudio, la VDE no resultó útil para establecer la existencia de disfunción endotelial en la migraña.
3. La disfunción endotelial en los sujetos con migraña está presente de forma permanente y se refleja en la disminución de la capacidad de formar colonias de las EPCs en estos pacientes.
4. A mayor tiempo de evolución de la migraña la afectación de las EPCs es también mayor, y esto sugiere un carácter progresivo de la disfunción del endotelio.
5. Durante las crisis de migraña existe una mayor disfunción endotelial que, de nuevo, se percibe mediante marcadores biológicos (NO_x, CGRP y EPCs) y no mediante marcadores ultrasonográficos.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine: current understanding and treatment. *N Engl J Med*. 2002;346:257-270
2. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. Headache classification committee of the International Headache Society. *Cephalalgia*. 1988;8 Suppl 7:1-96
3. The international classification of headache disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*. 2004;24 Suppl 1:9-160
4. Leira R, Laínez JM, Pascual J, Díez-Tejedor E, Morales F, Titus F, Alberca R, García de Polavieja J. Estudio español de calidad de vida en la migraña (I). Perfil del paciente con migraña que acude a consultas de neurología. *Neurología*. 1998;13:287-291
5. Mateos V. Grupo de estudio de cefaleas SEN. Guía para el diagnóstico y tratamiento de las cefaleas. *Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología*. 2007
6. Ferrari MD. Migraine. *Lancet*. 1998;351:1043-1051
7. Pascual J, Combarros O, Leno C, Polo JM, Rebollo M, Berciano J. Distribución por diagnósticos del dolor de cabeza como motivo de consulta neurológica. *Med Clin (Barc)*. 1995;104:161-164
8. Stovner L, Hagen K, Jensen R, Katsarava Z, Lipton R, Scher A, Steiner T, Zwart JA. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*. 2007;27:193-210
9. Leonardi M, Steiner TJ, Scher AT, Lipton RB. The global burden of migraine: measuring disability in headache disorders with Who's classification of functioning, disability and health (ICF). *J Headache Pain*. 2005;6:429-440
10. Silberstein SD. Migraine. *Lancet*. 2004;363:381-391
11. Lipton RB, Bigal ME. The epidemiology of migraine. *Am J Med*. 2005;118 Suppl 1:3S-10S
12. Lipton RB, Bigal ME. Ten lessons on the epidemiology of migraine. *Headache*. 2007;47 Suppl 1:S2-9
13. Isler H. Thomas Willis' two chapters on headache of 1672: a first attempt to apply the "New science" to this topic. *Headache*. 1986;26:95-98
14. Graham JR, Wolff HG. Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatry* 1938;39:737-763

15. Tfelt-Hansen PC, Koehler PJ. History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*. 2008;28:877-886
16. Leao AA. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 1944;7:359-390
17. Pascual J, Castro ME. Fisiopatología de la migraña. *Neurología*. 1998;13:29-32
18. Lashey KS. Patterns of cerebral integration indicated by scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiatry*. 1941;46:331-339
19. Dalessio DJ. Is there a difference between classic and common migraine? What is migraine, after all? *Arch Neurol*. 1985;42:275-276
20. Sanchez del Río M, Bakker D, Wu O, Agosti R, Mitsikostas DD, Ostergaard L, Wells WA, Rosen BR, Sorensen G, Moskowitz MA, Cutrer FM. Perfusion weighted imaging during migraine: spontaneous visual aura and headache. *Cephalalgia*. 1999;19:701-707
21. Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13:307-311
22. Leira R, Noya M. Fisiopatología de la migraña. *Rev Clin Esp*. 1995;195:16-19
23. Quintela E, Castillo J, Muñoz P, Pascual J. Premonitory and resolution symptoms in migraine: a prospective study in 100 unselected patients. *Cephalalgia*. 2006;26:1051-1060
24. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*. 2004;350:1104-1110
25. Welch KM. Concepts of migraine headache pathogenesis: insights into mechanisms of chronicity and new drug targets. *Neurol Sci*. 2003;24 Suppl 2:S149-153
26. Milner PM. Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1958;10:705
27. Lauritzen M. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia*. 2001;21:757-760
28. James MF, Smith JM, Boniface SJ, Huang CL, Leslie RA. Cortical spreading depression and migraine: new insights from imaging? *Trends Neurosci*. 2001;24:266-271
29. Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR, Karle A. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Ann Neurol*. 1990;28:791-798
30. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: Bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*. 1994;331:1689-1692

31. Hadjikhani N, Sanchez Del Río M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4687-4692
32. Sanchez del Río M, Alvarez Linera J. Functional neuroimaging of headaches. *Lancet Neurol*. 2004;3:645-651
33. Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N, Welch KM. Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann Neurol*. 2001;50:582-587
34. Castillo J, Martínez F, Leira R, Prieto JM, Lema M, Noya M. Cambios en los aminoácidos excitatorios durante y entre las crisis de migraña. *Neurología*. 1994;9:42-45
35. Martínez F, Castillo J, Rodríguez JR, Leira R, Noya M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia*. 1993;13:89-93
36. Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*. 1994;117 (Pt 1):199-210
37. Moskowitz MA, Bolay H, Dalkara T. Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes. *Ann Neurol*. 2004;55:276-280
38. Lian XY, Stringer JL. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res*. 2004;1012:177-184
39. Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. The dynamics of nitric oxide release measured directly and in real time following repeated waves of cortical spreading depression in the anaesthetised cat. *Neurosci Lett*. 1997;232:127-130
40. Obrenovitch TP, Urenjak J, Wang M. Nitric oxide formation during cortical spreading depression is critical for rapid subsequent recovery of ionic homeostasis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:680-688
41. Wang M, Obrenovitch TP, Urenjak J. Effects of the nitric oxide donor, DEA/NO, on cortical spreading depression. *Neuropharmacology*. 2003;44:949-957
42. González de la Aleja J, Porta-Etessam J, Sepúlveda-Sánchez JM, Rodríguez Pena-Marín M. La fisiopatología de la migraña. Reflexiones sobre la hipótesis glutamatérgica. *Rev Neurol*. 2006;43:481-488
43. Hauge AW, Asghar MS, Schytz HW, Christensen K, Olesen J. Effects of tonabersat on migraine with aura: a randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study. *Lancet Neurol*. 2009;8:718-723
44. Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med*. 1995;1:658-660

45. Bahra A, Matharu MS, Buchel C, Frackowiak RS, Goadsby PJ. Brainstem activation specific to migraine headache. *Lancet*. 2001;357:1016-1017
46. Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmuller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhaupl KM, Dirnagl U. Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain*. 2002;125:102-112
47. Lance JW. Fifty years of migraine research. *Aust N Z J Med*. 1988;18:311-317
48. Goadsby PJ, Zagami AS, Lambert GA. Neural processing of craniovascular pain: a synthesis of the central structures involved in migraine. *Headache*. 1991;31:365-371
49. Bonvento G, MacKenzie ET, Edvinsson L. Serotonergic innervation of the cerebral vasculature: relevance to migraine and ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev*. 1991;16:257-263
50. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol*. 1988;23:193-196
51. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol*. 1984;16:157-168
52. Villalon CM, Centurion D, Valdivia LF, De Vries P, Saxena PR. An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proc West Pharmacol Soc*. 2002;45:199-210
53. Rebeck GW, Maynard KI, Hyman BT, Moskowitz MA. Selective 5-HT_{1D} alpha serotonin receptor gene expression in trigeminal ganglia: implications for antimigraine drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3666-3669
54. Leira R, Castillo J, Martínez F, Castro A, Lema M, Noya M. Plaquetas y migraña. Correlación entre marcadores moleculares de agregación plaquetaria y serotonina. *Neurología*. 1991;6:10-12
55. Pascual J, Del Arco C, Romon T, Del Olmo E, Pazos A. Sumatriptan binding sites in human brain: regional-dependent labelling of 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptors. *Eur J Pharmacol*. 1996;295:271-274
56. Pascual J, Muñoz P. Correlation between lipophilicity and triptan outcomes. *Headache*. 2005;45:3-6
57. Pascual J, Del Arco C, Romon T, del Olmo E, Castro E, Pazos A. Autoradiographic distribution of sumatriptan-binding sites in post-mortem human brain. *Cephalalgia*. 1996;16:317-322
58. Leira R, Sobrino T, Rodríguez-Yanez M, Blanco M, Arias S, Castillo J. MMP-9 immunoreactivity in acute migraine. *Headache*. 2007;47:698-702

59. Peroutka SJ. Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Mol Interv.* 2005;5:304-311
60. Moskowitz MA, Buzzi MG. Neuroeffector functions of sensory fibres: implications for headache mechanisms and drug actions. *J Neurol.* 1991;238 Suppl 1:S18-22
61. Durham PL. CGRP-receptor antagonists: a fresh approach to migraine therapy? *N Engl J Med.* 2004;350:1073-1075
62. Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald DM, Nadel JA. NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *Am J Physiol.* 1995;268:L263-269
63. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A. The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;49:65-76
64. Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci.* 1987;7:4129-4136
65. Schoonman GG, van der Grond J, Kortmann C, van der Geest RJ, Terwindt GM, Ferrari MD. Migraine headache is not associated with cerebral or meningeal vasodilatation: a 3T magnetic resonance angiography study. *Brain.* 2008;131:2192-2200
66. Amara SG, Arriza JL, Leff SE, Swanson LW, Evans RM, Rosenfeld MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science.* 1985;229:1094-1097
67. Quirion R, Van Rossum D, Dumont Y, St-Pierre S, Fournier A. Characterization of CGRP1 and CGRP2 receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;657:88-105
68. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996;17:533-585
69. Poyner D, Marshall I. CGRP receptors: beyond the CGRP(1)-CGRP(2) subdivision? *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:223
70. Hoppener JW, Steenbergh PH, Zandberg J, Geurts van Kessel AH, Baylin SB, Nelkin BD, Jansz HS, Lips CJ. The second human calcitonin/CGRP gene is located on chromosome 11. *Hum Genet.* 1985;70:259-263
71. Edvinsson L. Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment of headache. *Cephalalgia.* 2004;24:611-622
72. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature.* 1985;313:54-56
73. McCulloch J, Uddman R, Kingman TA, Edvinsson L. Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:5731-5735

74. Conner AC, Simms J, Barwell J, Wheatley M, Poyner DR. Ligand binding and activation of the CGRP receptor. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:729-732
75. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54:233-246
76. Struthers AD, Brown MJ, Macdonald DW, Beacham JL, Stevenson JC, Morris HR, MacIntyre I. Human calcitonin gene related peptide: a potent endogenous vasodilator in man. *Clin Sci (Lond).* 1986;70:389-393
77. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6155-6160
78. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PTDINS(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature.* 2001;411:957-962
79. Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis JB, Geppetti P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci.* 2002;5:546-551
80. Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252:403-409
81. Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel. *Brain Res.* 1990;506:287-290
82. Geppetti P, Capone JG, Trevisani M, Nicoletti P, Zagli G, Tola MR. CGRP and migraine: neurogenic inflammation revisited. *J Headache Pain.* 2005;6:61-70
83. Van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21:649-678
84. Aiyar N, Disa J, Stadel JM, Lysko PG. Calcitonin gene-related peptide receptor independently stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca²⁺ signaling pathways. *Mol Cell Biochem.* 1999;197:179-185
85. De Hoon JN, Pickkers P, Smits P, Struijker-Boudier HA, Van Bortel LM. Calcitonin gene-related peptide: exploring its vasodilating mechanism of action in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:312-321

86. Gray DW, Marshall I. Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1992;107:691-696
87. Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:9-14
88. Williamson DJ, Hargreaves RJ. Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech.* 2001;53:167-178
89. Lassen LH, Jacobsen VB, Haderslev PA, Sperling B, Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Involvement of calcitonin gene-related peptide in migraine: regional cerebral blood flow and blood flow velocity in migraine patients. *J Headache Pain.* 2008;9:151-157
90. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia.* 2002;22:54-61
91. Juhasz G, Zsombok T, Modos EA, Olajos S, Jakab B, Nemeth J, Szolcsanyi J, Vitrai J, Bagdy G. No-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain.* 2003;106:461-470
92. Kruuse C, Iversen HK, Jansen-Olesen I, Edvinsson L, Olesen J. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) levels during glyceryl trinitrate (GTN)-induced headache in healthy volunteers. *Cephalalgia.* 2009
93. Frese A, Schilgen M, Edvinsson L, Frandsen E, Evers S. Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache. *Cephalalgia.* 2005;25:700-703
94. Piper RD, Edvinsson L, Ekman R, Lambert GA. Cortical spreading depression does not result in the release of calcitonin gene-related peptide into the external jugular vein of the cat: relevance to human migraine. *Cephalalgia.* 1993;13:180-183
95. Durham PL. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. *Headache.* 2006;46 Suppl 1:S3-8
96. Tfelt-Hansen P, Le H. Calcitonin gene-related peptide in blood: is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review. *J Headache Pain.* 2009;10:137-143
97. Bellamy J, Bowen EJ, Russo AF, Durham PL. Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *Eur J Neurosci.* 2006;23:2057-2066
98. Hansen JM, Petersen J, Wienecke T, Olsen KS, Jensen LT, Ashina M. Sumatriptan does not change calcitonin gene-related peptide in the cephalic and extracephalic circulation in healthy volunteers. *J Headache Pain.* 2009;10:85-91

99. Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol.* 1993;33:48-56
100. Limmroth V, Katsarava Z, Liedert B, Guehring H, Schmitz K, Diener HC, Michel MC. An in vivo rat model to study calcitonin gene related peptide release following activation of the trigeminal vascular system. *Pain.* 2001;92:101-106
101. Zagami AS, Goadsby PJ, Edvinsson L. Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides.* 1990;16:69-75
102. Schifter S. Circulating concentrations of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in normal man determined with a new, highly sensitive radioimmunoassay. *Peptides.* 1991;12:365-369
103. Girgis SI, Macdonald DW, Stevenson JC, Bevis PJ, Lynch C, Wimalawansa SJ, Self CH, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet.* 1985;2:14-16
104. Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J. No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol.* 2005;58:561-568
105. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Schifter S, Olesen J. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks. *Pain.* 2000;86:133-138
106. Gupta R, Ahmed T, Banerjee B, Bhatia M. Plasma calcitonin gene-related peptide concentration is comparable to control group among migraineurs and tension type headache subjects during inter-ictal period. *J Headache Pain.* 2009;10:161-166
107. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol.* 1990;28:183-187
108. Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, Trequattrini A, Palumbo R. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia.* 1995;15:384-390
109. Akerman S, Williamson DJ, Kaube H, Goadsby PJ. The effect of anti-migraine compounds on nitric oxide-induced dilation of dural meningeal vessels. *Eur J Pharmacol.* 2002;452:223-228
110. De Hoon JN, Smits P, Troost J, Struijker-Boudier HA, Van Bortel LM. Forearm vascular response to nitric oxide and calcitonin gene-related peptide: comparison between migraine patients and control subjects. *Cephalalgia.* 2006;26:56-63
111. Recober A, Kuburas A, Zhang Z, Wemmie JA, Anderson MG, Russo AF. Role of calcitonin gene-related peptide in light-aversive behavior: implications for migraine. *J Neurosci.* 2009;29:8798-8804
112. Tfelt-Hansen P, De Vries P, Saxena PR. Triptans in migraine: a comparative review of pharmacology, pharmacokinetics and efficacy. *Drugs.* 2000;60:1259-1287

113. Smith D, Hill RG, Edvinsson L, Longmore J. An immunocytochemical investigation of human trigeminal nucleus caudalis: CGRP, substance P and 5-HT_{1D}-receptor immunoreactivities are expressed by trigeminal sensory fibres. *Cephalalgia*. 2002;22:424-431
114. Ramadan NM, Skljarevski V, Phebus LA, Johnson KW. 5-HT_{1F} receptor agonists in acute migraine treatment: A hypothesis. *Cephalalgia*. 2003;23:776-785
115. Gomez-Mancilla B, Cutler NR, Leibowitz MT, Spierings EL, Klapper JA, Diamond S, Goldstein J, Smith T, Couch JR, Fleishaker J, Azie N, Blunt DE. Safety and efficacy of PNU-142633, a selective 5-HT_{1D} agonist, in patients with acute migraine. *Cephalalgia*. 2001;21:727-732
116. Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM. Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology*. 2008;70:1304-1312
117. Tepper SJ, Cleves C. Telcagepant, a calcitonin gene-related peptide antagonist for the treatment of migraine. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10:711-720
118. Durham PL, Niemann C, Cady R. Repression of stimulated calcitonin gene-related peptide secretion by topiramate. *Headache*. 2006;46:1291-1295
119. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142
120. Gulbenkian S, Uddman R, Edvinsson L. Neuronal messengers in the human cerebral circulation. *Peptides*. 2001;22:995-1007
121. Diener HC. RPR100893, a substance-P antagonist, is not effective in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia*. 2003;23:183-185
122. Goldstein DJ, Wang O, Saper JR, Stoltz R, Silberstein SD, Mathew NT. Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalalgia*. 1997;17:785-790
123. Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia*. 2008;28:226-236
124. Goadsby PJ. Pathophysiology of migraine. *Neurol Clin*. 2009;27:335-360
125. Goadsby PJ, MacDonald GJ. Extracranial vasodilation mediated by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *Brain Res*. 1985;329:285-288
126. Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain*. 2009;132:16-25
127. McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation*. 1999;6:7-22

128. Laird JM, Olivar T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience*. 2000;98:345-352
129. Welch KM. Contemporary concepts of migraine pathogenesis. *Neurology*. 2003;61:S2-8
130. Chesterman CN. Vascular endothelium, haemostasis and thrombosis. *Blood Rev*. 1988;2:88-94
131. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004;84:869-901
132. Liebner S, Cavallaro U, Dejana E. The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1431-1438
133. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:168-175
134. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108:2054-2059
135. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90:40L-48L
136. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323:27-36
137. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006:1-40
138. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1123:134-145
139. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L1179-1183
140. Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol*. 2006:107-144
141. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1835-1842
142. Tilki D, Hohn HP, Ergun B, Rafii S, Ergun S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends Mol Med*. 2009;15:501-509
143. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*. 2006;133:1543-1551
144. Castillo J, Leira R, Blanco M. Metaloproteasas y daño neurovascular. *Neurologia*. 2004;19:312-320

145. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90:251-262
146. Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol*. 1989;92:241-250
147. Benedict CR, Pakala R, Willerson JT. Endothelial-dependent procoagulant and anticoagulant mechanisms. Recent advances in understanding. *Tex Heart Inst J*. 1994;21:86-90
148. Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39:343-350
149. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000;440:653-666
150. Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MA, Jr., Strominger JL, Pober JS. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:4917-4921
151. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (SICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw*. 2004;15:91-98
152. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006:213-254
153. Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med*. 1988;319:512-513
154. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997;39:287-324
155. Benzuly KH, Padgett RC, Kaul S, Piegors DJ, Armstrong ML, Heistad DD. Functional improvement precedes structural regression of atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89:1810-1818
156. Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y. Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:12-17
157. Karpha M, Lip GV. The pathophysiology of target organ damage in hypertension. *Minerva Cardioangiol*. 2006;54:417-429
158. McVeigh GE, Cohn JN. Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*. 2003;3:87-92
159. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*. 1997;80:111-161

160. Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep.* 2008;60:119-126
161. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126
162. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1149-1160
163. Chen IC, Chao TH, Tsai WC, Li YH. Rosiglitazone reduces plasma levels of inflammatory and hemostatic biomarkers and improves global endothelial function in habitual heavy smokers without diabetes mellitus or metabolic syndrome. *J Formos Med Assoc.* 2010;109:113-119
164. Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J. Platelets, inflammation, and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis.* 2005;20 Suppl 2:32-39
165. De la Riva IJ, Roson MI, Vega GW, Speziale N, Albornoz LE, Palumbo EL, Ferrero AJ, Damiano PF. Effect of oral L-arginine administration for three weeks in two kidney-two clip hypertensive rats. *Arch Physiol Biochem.* 2000;108:415-421
166. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2003;108:933-938
167. Boulden BM, Widder JD, Allen JC, Smith DA, Al-Baldawi RN, Harrison DG, Dikalov SI, Jo H, Dudley SC, Jr. Early determinants of H₂O₂-induced endothelial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:810-817
168. Oshima T, Ozono R, Yano Y, Oishi Y, Teragawa H, Higashi Y, Yoshizumi M, Kambe M. Association of helicobacter pylori infection with systemic inflammation and endothelial dysfunction in healthy male subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1219-1222
169. Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F. Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:5076-5082
170. Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Salvetti A, Ferrannini E, Monzani F. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3731-3737
171. Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;54 Suppl 2:S65-72
172. Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation.* 2000;101:2258-2263

173. Santos-García D, Blanco M, Castillo J. The role of flow-mediated dilation in ischemic stroke: time for action. In press. 2010
174. Libby P, Aikawa M, Jain MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;285-306
175. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:404-433
176. Chen LY, Mehta P, Mehta JL. Oxidized LDL decreases L-arginine uptake and nitric oxide synthase protein expression in human platelets: relevance of the effect of oxidized LDL on platelet function. *Circulation*. 1996;93:1740-1746
177. Okonski P, Banach M, Rysz J, Barylski M, Irzmanski R, Piechota M, Zaslonska J. L-arginine improves hemodynamic function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Ann Transplant*. 2006;11:28-34
178. Strawn WB, Ferrario CM. Mechanisms linking angiotensin ii and atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:505-512
179. Berliner J, Leitinger N, Watson A, Huber J, Fogelman A, Navab M. Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb Haemost*. 1997;78:195-199
180. Panes J, Kurose I, Rodriguez-Vaca D, Anderson DC, Miyasaka M, Tso P, Granger DN. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation*. 1996;93:161-167
181. Burke A, Fitzgerald GA. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;46:79-90
182. Rodrigo R, Passalacqua W, Araya J, Orellana M, Rivera G. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42:453-461
183. Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106:184-190
184. Rubanyi GM, Johns A, Kauser K. Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:89-98
185. Granger DN, Vowinkel T, Petnehazy T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension*. 2004;43:924-931
186. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14:44S-54S

187. Buchner K, Henn V, Grafe M, de Boer OJ, Becker AE, KroczeK RA. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40-CD40L signalling in atherosclerosis. *J Pathol.* 2003;201:288-295
188. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: part II. *Circulation.* 2003;108:2041-2048
189. Donnelly R, Collinson DJ, Manning G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens.* 2003;21:1627-1630
190. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res.* 2004;94:1168-1178
191. Fuster V, Lewis a. Conner memorial lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 1994;90:2126-2146
192. Szmítko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation.* 2003;107:3093-3100
193. Benjamin N, Calver A, Collier J, Robinson B, Vallance P, Webb D. Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. *Hypertension.* 1995;25:918-923
194. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:1235-1241
195. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-1051
196. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376
197. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2:997-1000
198. Simon A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54:211-217
199. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111-1115
200. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol.* 2005;568:357-369

201. Anderson EA, Mark AL. Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation*. 1989;79:93-100
202. Laurent S, Lacolley P, Brunel P, Laloux B, Pannier B, Safar M. Flow-dependent vasodilation of brachial artery in essential hypertension. *Am J Physiol*. 1990;258:H1004-1011
203. Cooke JP, Rossitch E, Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest*. 1991;88:1663-1671
204. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319
205. Schwartz BG, Economides C, Mayeda GS, Burstein S, Kloner RA. The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy. *Int J Impot Res*. 2010;22:77-90
206. Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates GAB1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005;280:12305-12309
207. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ Res*. 1993;72:1276-1284
208. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:374-380
209. Kuchan MJ, Frangos JA. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and CGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol*. 1993;264:H150-156
210. Martin CM, Beltran-Del-Rio A, Albrecht A, Lorenz RR, Joyner MJ. Local cholinergic mechanisms mediate nitric oxide-dependent flow-induced vasorelaxation in vitro. *Am J Physiol*. 1996;270:H442-446
211. Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50:397-404
212. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-265
213. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-253

214. Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Vita JA. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham heart study. *Circulation*. 2004;109:613-619
215. Pyke KE, Dwyer EM, Tschakovsky ME. Impact of controlling shear rate on flow-mediated dilation responses in the brachial artery of humans. *J Appl Physiol*. 2004;97:499-508
216. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-476
217. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994;121:936-941
218. Otto ME, Svatikova A, Barretto RB, Santos S, Hoffmann M, Khandheria B, Somers V. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. *Circulation*. 2004;109:2507-2510
219. Chen PL, Wang PY, Sheu WH, Chen YT, Ho YP, Hu HH, Hsu HY. Changes of brachial flow-mediated vasodilation in different ischemic stroke subtypes. *Neurology*. 2006;67:1056-1058
220. Santos-García D, Blanco M, Serena J, Arias S, Millan M, Rodríguez-Yáñez M, Leira R, Dávalos A, Castillo J. Brachial arterial flow mediated dilation in acute ischemic stroke. *Eur J Neurol*. 2009;16:684-690
221. Ekmekci A, Abaci N, Colak Ozbey N, Agayev A, Aksakal N, Oflaz H, Erginel-Unaltuna N, Erbil Y. Endothelial function and endothelial nitric oxide synthase intron 4A/B polymorphism in primary hyperparathyroidism. *J Endocrinol Invest*. 2009;32:611-616
222. Ulusoy RE, Karabudak O, Yokusoglu M, Kilicaslan F, Kirilmaz A, Cebeci BS. Noninvasive assessment of impaired endothelial function in psoriasis. *Rheumatol Int*. 2010;30:479-483
223. Ulusoy RE, Karabudak O, Kilicaslan F, Kirilmaz A, Us MH, Cebeci BS. Noninvasive assessment of impaired endothelial dysfunction in mucocutaneous Behcet's disease. *Rheumatol Int*. 2008;28:617-621
224. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, Bernstein RM, Bruce IN. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation*. 2004;110:399-404
225. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest*. 2005;127:2254-2263
226. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78:22-27

227. Schroeder S, Enderle MD, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Pfohl M, Herdeg C, Oberhoff M, Haering HU, Karsch KR. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J.* 1999;138:731-739
228. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Voutsas AA, Stamatelopoulos SF, Mouloupoulos SD. Peripheral vascular endothelial dysfunction in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:541-546
229. Sinisalo J, Paronen J, Mattila KJ, Syrjala M, Alftan G, Palosuo T, Nieminen MS, Vaarala O. Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2000;149:403-411
230. Harris RA, Padilla J, Rink LD, Wallace JP. Variability of flow-mediated dilation measurements with repetitive reactive hyperemia. *Vasc Med.* 2006;11:1-6
231. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Ronnema T, Raitakari OT. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young finns study. *Circulation.* 2004;110:2918-2923
232. Rundek T, Hundle R, Ratchford E, Ramas R, Sciacca R, Di Tullio MR, Boden-Albala B, Miyake Y, Elkind MS, Sacco RL, Homma S. Endothelial dysfunction is associated with carotid plaque: a cross-sectional study from the population based Northern Manhattan study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006;6:35
233. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the cardiovascular health study. *Circulation.* 2007;115:2390-2397
234. Shutov AA, Baidina TV, Agafonov AV, Siutkina OV, Gaidash GV. Endothelium dysfunction in patients with ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2005:42-45
235. Vita JA, Keane JF, Jr. Exercise: toning up the endothelium? *N Engl J Med.* 2000;342:503-505
236. Anderson TJ. Prognostic significance of brachial flow-mediated vasodilation. *Circulation.* 2007;115:2373-2375
237. Chan SY, Mancini GB, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1037-1043
238. Patti G, Pasceri V, Melfi R, Goffredo C, Chello M, D'Ambrosio A, Montesanti R, Di Sciascio G. Impaired flow-mediated dilation and risk of restenosis in patients undergoing coronary stent implantation. *Circulation.* 2005;111:70-75

239. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105:1567-1572
240. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120:502-509
241. Hirata Y, Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Suzuki J, Nagai R. Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease. *Int Heart J*. 2010;51:1-6
242. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, Staton J, Yi Q. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke*. 2003;34:2132-2137
243. Pretnar-Oblak J, Sabovic M, Sebestjen M, Pogacnik T, Zaletel M. Influence of atorvastatin treatment on L-arginine cerebrovascular reactivity and flow-mediated dilatation in patients with lacunar infarctions. *Stroke*. 2006;37:2540-2545
244. Lavi S, Gaitini D, Milloul V, Jacob G. Impaired cerebral CO₂ vasoreactivity: association with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1856-1861
245. Harer C, von Kummer R. Cerebrovascular CO₂ reactivity in migraine: Assessment by transcranial doppler ultrasound. *J Neurol*. 1991;238:23-26
246. Thomsen LL, Iversen HK, Olesen J. Increased cerebrovascular pCO₂ reactivity in migraine with aura: a transcranial doppler study during hyperventilation. *Cephalalgia*. 1995;15:211-215
247. Vernieri F, Tibuzzi F, Pasqualetti P, Altamura C, Palazzo P, Rossini PM, Silvestrini M. Increased cerebral vasomotor reactivity in migraine with aura: an autoregulation disorder? A transcranial doppler and near-infrared spectroscopy study. *Cephalalgia*. 2008;28:689-695
248. Silva FA, Rueda-Clausen CF, Silva SY, Zarruk JG, Guzman JC, Morillo CA, Vesga B, Pradilla G, Flórez M, López-Jaramillo P. Endothelial function in patients with migraine during the interictal period. *Headache*. 2007;47:45-51
249. Yetkin E, Ozisik H, Ozcan C, Aksoy Y, Turhan H. Decreased endothelium-dependent vasodilatation in patients with migraine: a new aspect to vascular pathophysiology of migraine. *Coron Artery Dis*. 2006;17:29-33
250. Vanmolkot FH, Van Bortel LM, de Hoon JN. Altered arterial function in migraine of recent onset. *Neurology*. 2007;68:1563-1570
251. Vernieri F, Moro L, Altamura C, Palazzo P, Antonelli Incalzi R, Rossini PM, Pedone C. Patients with migraine with aura have increased flow mediated dilation. *BMC Neurol*. 2010;10:18

252. Thomsen LL, Iversen HK, Brinck TA, Olesen J. Arterial supersensitivity to nitric oxide (nitroglycerin) in migraine sufferers. *Cephalalgia*. 1993;13:395-399; discussion 376
253. Thomsen LL. Investigations into the role of nitric oxide and the large intracranial arteries in migraine headache. *Cephalalgia*. 1997;17:873-895
254. Napoli R, Guardasole V, Zarra E, Matarazzo M, D'Anna C, Sacca F, Affuso F, Cittadini A, Carrieri PB, Sacca L. Vascular smooth muscle cell dysfunction in patients with migraine. *Neurology*. 2009;72:2111-2114
255. Kurth T, Gaziano JM, Cook NR, Logroscino G, Diener HC, Buring JE. Migraine and risk of cardiovascular disease in women. *JAMA*. 2006;296:283-291
256. Hamed SA, Hamed EA, Ezz Eldin AM, Mahmoud NM. Vascular risk factors, endothelial function, and carotid thickness in patients with migraine: relationship to atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2010;19:92-103
257. De Hoon JN, Willigers JM, Troost J, Struijker-Boudier HA, van Bortel LM. Cranial and peripheral interictal vascular changes in migraine patients. *Cephalalgia*. 2003;23:96-104
258. Okamoto M, Etani H, Yagita Y, Kinoshita N, Nukada T. Diminished reserve for cerebral vasomotor response to L-arginine in the elderly: evaluation by transcranial doppler sonography. *Gerontology*. 2001;47:131-135
259. Edvinsson ML, Edvinsson L. Comparison of CGRP and no responses in the human peripheral microcirculation of migraine and control subjects. *Cephalalgia*. 2008;28:563-566
260. Tietjen GE, Herial NA, White L, Utley C, Kosmyna JM, Khuder SA. Migraine and biomarkers of endothelial activation in young women. *Stroke*. 2009;40:2977-2982
261. Ciancarelli I, Tozzi-Ciancarelli MG, Di Massimo C, Marini C, Carolei A. Urinary nitric oxide metabolites and lipid peroxidation by-products in migraine. *Cephalalgia*. 2003;23:39-42
262. Bianchi A, Pitari G, Amenta V, Giuliano F, Gallina M, Costa R, Ferlito S. Endothelial, haemostatic and haemorheological modifications in migraineurs. *Artery*. 1996;22:93-100
263. Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: The first 30 years. *Thromb Haemost*. 2006;95:49-55
264. Anderson TJ. Arterial stiffness or endothelial dysfunction as a surrogate marker of vascular risk. *Can J Cardiol*. 2006;22 Suppl B:72B-80B
265. Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*. 2003;107:3141-3145

266. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-1474
267. Kurth T, Ridker PM, Buring JE. Migraine and biomarkers of cardiovascular disease in women. *Cephalalgia*. 2008;28:49-56
268. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309
269. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1538-1547
270. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim DH, Kim EH, Choe VN, Kim JH, Im WS, Kang L, Park JE, Park HJ, Park HK, Song EC, Lee SK, Kim M, Roh JK. Decreased number and function of endothelial progenitor cells in patients with migraine. *Neurology*. 2008;70:1510-1517
271. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38:87-104
272. Gorren AC, Mayer B. Nitric-oxide synthase: A cytochrome p450 family foster child. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:432-445
273. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:4
274. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615
275. Jones CJ, Kuo L, Davis MJ, DeFily DV, Chilian WM. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation*. 1995;91:1807-1813
276. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258:1898-1902
277. Shimomura T, Murakami F, Kotani K, Ikawa S, Kono S. Platelet nitric oxide metabolites in migraine. *Cephalalgia*. 1999;19:218-222
278. Cooke JP, Tsao PS. Go with the flow. *Circulation*. 2001;103:2773-2775
279. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR, Jr., Saito T, Miura M, Gutterman DD. Flow-induced dilation of human coronary arterioles: important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circulation*. 2001;103:1992-1998
280. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA*. 1999;282:2035-2042

281. Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T, Kelm M. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:295-301
282. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012
283. Lassen LH, Thomsen LL, Olesen J. Histamine induces migraine via the H1-receptor. Support for the no hypothesis of migraine. *Neuroreport.* 1995;6:1475-1479
284. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15:149-153
285. Olesen J. The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol Ther.* 2008;120:157-171
286. Holzer P, Jovic M. Cutaneous vasodilatation induced by nitric oxide-evoked stimulation of afferent nerves in the rat. *Br J Pharmacol.* 1994;112:1181-1187
287. Wei EP, Moskowitz MA, Boccalini P, Kontos HA. Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilation in feline cerebral arterioles. *Circ Res.* 1992;70:1313-1319
288. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain.* 1994;117:427-434
289. Jansen-Olesen I, Zhou M, Zinck T, Xu CB, Edvinsson L. Expression of inducible nitric oxide synthase in trigeminal ganglion cells during culture. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97:355-363
290. Gallai V, Floridi A, Mazzotta G, Codini M, Tognoloni M, Vulcano MR, Sartori M, Russo S, Alberti A, Michele F, Sarchielli P. L-arginine/nitric oxide pathway activation in platelets of migraine patients with and without aura. *Acta Neurol Scand.* 1996;94:151-160
291. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5193-5197
292. Nattero G, Mengozzi G, Inconis T, Paradisi L. Nitric oxide, endothelin-1, and transcranial doppler in migraine. Findings in interictal conditions and during migraine attack. *Headache.* 1996;36:307-311
293. D'Amico D, Ferraris A, Leone M, Catania A, Carlin A, Grazzi L, Bussone G. Increased plasma nitrites in migraine and cluster headache patients in interictal period: basal hyperactivity of L-arginine-no pathway? *Cephalalgia.* 2002;22:33-36
294. Sarchielli P, Tognoloni M, Russo S, Vulcano MR, Feleppa M, Mala M, Sartori M, Gallai V. Variations in the platelet arginine/nitric oxide pathway during the ovarian cycle in females affected by menstrual migraine. *Cephalalgia.* 1996;16:468-475

295. Martelletti P, D'Alo S, Stirparo G, Rinaldi C, Cifone MG, Giacobuzzo M. Modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide donor compounds in migraine. *Int J Clin Lab Res*. 1998;28:135-139
296. Kitano A, Shimomura T, Takeshima T, Takahashi K. Increased 11-dehydrothromboxane b2 in migraine: platelet hyperfunction in patients with migraine during headache-free period. *Headache*. 1994;34:515-518
297. Yilmaz G, Surer H, Inan LE, Coskun O, Yucel D. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. *Tohoku J Exp Med*. 2007;211:23-30
298. Shukla R, Barthwal MK, Srivastava N, Nag D, Seth PK, Srimal RC, Dikshit M. Blood nitrite levels in patients with migraine during headache-free period. *Headache*. 2001;41:475-481
299. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, Olesen J. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia*. 1998;18:27-32
300. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Boger R. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:490-496
301. Guldiken B, Demir M, Guldiken S, Turgut N, Ozkan H, Kabayel L, Tugrul A. Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in migraine during the interictal period. *J Clin Neurosci*. 2009;16:672-674
302. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*. 2002;29:10-14
303. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:133-158
304. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:795-803
305. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985
306. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161:851-858
307. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246:1309-1312
308. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26:25-35

309. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676
310. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25:581-611
311. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60:203-212
312. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001;2001:21
313. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228
314. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18:3964-3972
315. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000;86:1198-1202
316. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31
317. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009;89:607-648
318. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of als. *Nat Neurosci*. 2005;8:85-92
319. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003;111:1843-1851
320. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:488-494
321. Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, Dávalos A. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2007;9:205-212
322. Nicoletti JN, Shah SK, McCloskey DP, Goodman JH, Elkady A, Atassi H, Hylton D, Rudge JS, Scharfman HE, Croll SD. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status

- epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience*. 2008;151:232-241
323. Silberstein SD. Migraine pathophysiology and its clinical implications. *Cephalalgia*. 2004;24 Suppl 2:2-7
324. Scharfman HE, MacLusky NJ. Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurological disorders. *Headache*. 2008;48 Suppl 2:S77-89
325. Toriello M, Oterino A, Castillo J, Campo L, Trespalacios V, Alonso Arranz A, Mateos V, Colás R, Pascual Gómez J. Análisis del VEGF en migrañosos. *Neurología*. 2009;24:706
326. Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med*. 2006;24:379-388
327. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: From biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:88-96
328. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600
329. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967
330. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367
331. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-958
332. Burger PE, Coetzee S, McKeenan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood*. 2002;100:3527-3535
333. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109:337-346
334. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Endothelial progenitor cells in health and disease. *Histol Histopathol*. 2005;20:1351-1358
335. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng*. 2006;12:331-335
336. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1185-1189

337. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174
338. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, Hwang KK, Oh S, Choi YJ, Chae IH, Oh BH, Choi YS, Walsh K, Park YB. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation*. 2003;108:2918-2925
339. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005;93:228-235
340. Re F, Zanetti A, Sironi M, Polentarutti N, Lanfrancone L, Dejana E, Colotta F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1994;127:537-546
341. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389-395
342. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1143-1151
343. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1804-1810
344. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther*. 2002;9:631-641
345. Roberts N, Jahangiri M, Xu Q. Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med*. 2005;9:583-591
346. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438
347. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1442-1447
348. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106:2781-2786
349. Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker SD, Poole-Wilson PA, Borlak J, Ertl G, Bauersachs J. Age-dependent impairment of

- endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res.* 2007;100:434-443
350. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO, 3rd. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:296-301
351. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-2890
352. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007
353. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-2987
354. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7
355. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, Sher F, O'Rourke F, Nasser AM, Schwandt B, Todd K. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke.* 2005;36:151-153
356. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-coA reductase inhibitor mobilizes bone marrow: derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2001;108:399-405
357. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R, Dávalos A, Lizasoain I, Castillo J. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke.* 2007;38:2759-2764
358. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 2002;415:45-53
359. Geiger H, Van Zant G. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol.* 2002;3:329-333
360. Bousser MG, Welch KM. Relation between migraine and stroke. *Lancet Neurol.* 2005;4:533-542

361. Etmnan M, Takkouche B, Isorna FC, Samii A. Risk of ischaemic stroke in people with migraine: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*. 2005;330:63
362. Bigal ME, Kurth T, Hu H, Santanello N, Lipton RB. Migraine and cardiovascular disease: Possible mechanisms of interaction. *Neurology*. 2009;72:1864-1871
363. Kurth T, Slomke MA, Kase CS, Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, Diener HC, Buring JE. Migraine, headache, and the risk of stroke in women: A prospective study. *Neurology*. 2005;64:1020-1026
364. Dichgans M, Mayer M, Uttner I, Bruning R, Muller-Hocker J, Rungger G, Ebke M, Klockgether T, Gasser T. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol*. 1998;44:731-739
365. O'Keeffe ST, Tsapatsaris NP, Beetham WP, Jr. Increased prevalence of migraine and chest pain in patients with primary Raynaud disease. *Ann Intern Med*. 1992;116:985-989
366. Yetkin E, Ozisik H, Ozcan C, Aksoy Y, Turhan H. Increased dilator response to nitrate and decreased flow-mediated dilatation in migraineurs. *Headache*. 2007;47:104-110
367. Sarchielli P, Alberti A, Baldi A, Coppola F, Rossi C, Pierguidi L, Floridi A, Calabresi P. Proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and lymphocyte integrin expression in the internal jugular blood of migraine patients without aura assessed ictally. *Headache*. 2006;46:200-207
368. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003;112:160-169
369. Masuda J, Mitsuyama K, Yamasaki H, Takedatsu H, Okamura T, Andoh A, Murohara T, Asahara T, Sata M. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med*. 2007;19:221-228
370. Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, Weigel G, Schwarzingler I, Wolozczuk W, Steiner G, Smolen JS. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2005;111:204-211
371. Tietjen GE. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia*. 2009;29:987-996
372. Schwedt TJ. Endothelial dysfunction in migraine. *Cephalalgia*. 2009;29:997-1002
373. Tsikas D, Rossa S, Sandmann J, Frolich JC. High-performance liquid chromatographic analysis of nitrite and nitrate in human plasma as S-nitroso-N-acetylcysteine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;724:199-201
374. Stewart WF, Shechter A, Lipton RB. Migraine heterogeneity. Disability, pain intensity, and attack frequency and duration. *Neurology*. 1994;44:S24-39

