

LISETE MARGARIDA MARTINS PONTE

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO NO
GENE DE SUSCEPTIBILIDADE PARA A
ENXAQUECA *STX1A*: ESTUDO NUMA
POPULAÇÃO CONTROLO DA ILHA DE SÃO
MIGUEL (AÇORES)**



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2012

LISETE MARGARIDA MARTINS PONTE

**CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO NO
GENE DE SUSCEPTIBILIDADE PARA A
ENXAQUECA *STX1A*: ESTUDO NUMA
POPULAÇÃO CONTROLO DA ILHA DE SÃO
MIGUEL (AÇORES)**

Tese de candidatura ao grau de Mestre
em Ciências Biomédicas, submetida à
Universidade dos Açores

Orientadoras:

Professora Doutora Manuela Lima
Professora Doutora Carolina Lemos
Doutora Maria Teresa Oliveira R. Cymbron

Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2012

AGRADECIMENTOS

Na elaboração deste trabalho foram muitas as pessoas que me auxiliaram e quero, por isso, aqui deixar o meu agradecimento às que foram essenciais à sua concretização.

À minha orientadora, Professora Doutora Manuela Lima, por me ter dado a oportunidade de integrar no seu grupo “ Human Genetics Group” e participar num projeto tão interessante no qual aprendi muito e onde pude desenvolver o meu mestrado. Os ensinamentos que me transmitiu permitiram-me crescer enquanto profissional e enquanto pessoa. Pelos seus conselhos e críticas que serviram sempre, para melhorar o meu empenho e desempenho. Pela sua constante disponibilidade e sabedoria, por tudo, o meu muito obrigada.

À Doutora Carolina Lemos, orientadora deste trabalho, que permitiu a colaboração entre o grupo de Epidemiologia e Genética Humana do CIRN (Universidade dos Açores) e o seu grupo do IBMC, um agradecimento muito especial pela orientação e confiança em primeiro lugar. Apesar da distância, quero agradecer a constante disponibilidade, atenção, sabedoria, transmissão de conhecimentos científicos, correções e as suas valiosas sugestões durante todo o processo desta dissertação. Aqui expresso o meu mais sincero agradecimento.

À Doutora Teresa Cymbron, orientadora deste trabalho, um agradecimento especial pela orientação atenciosa, por todos os ensinamentos, pela compreensão e incentivo durante esta etapa.

À Dra. Mafalda Raposo, um agradecimento muito especial. Ao meu lado, no laboratório em todos os momentos, mesmos os mais difíceis. Obrigada por todo o apoio, ajuda e motivação que me deu durante a realização do meu trabalho para que conseguisse atingir os meus objetivos com a melhor das motivações e também, pelo grande companheirismo, boa-disposição e pela sua total disponibilidade de tempo. O meu muito obrigado.

À Doutora Nadiya Kazachkova, pela amizade, disponibilidade constante, que sempre me proporcionou, pela sua ajuda no laboratório, com as análises estatística e outras questões, por tudo muito obrigado.

À Doutora Amanda Ramos, agradeço todo o apoio, disponibilidade e ajuda na etapa final deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, a gratidão é infinita por tudo o que me têm proporcionado. Obrigada pelo vosso apoio incondicional, imprescindível para que conseguisse conquistar mais esta etapa na minha vida. Em especial também um muito obrigado à minha mãe, por toda a paciência demonstrada, pela compreensão e pelo apoio nos momentos mais difíceis no decorrer deste ano.

Não posso deixar de fazer aqui um agradecimento muito especial ao meu irmão António Ponte, sem ele a realização deste trabalho não teria sido possível. Muito obrigada pela sua ajuda na recolha das minhas amostras (sem ti não teria conseguido), disponibilidade, atenção, carinho, enfim por tudo, muito obrigada “hermano”.

Às minhas amigas e companheiras de Mestrado, São Araújo e Ana Ferreira, que me acompanharam neste percurso, pela sua amizade, pelas conversas intermináveis tanto sobre trabalho, como outros assuntos, pelo seu otimismo, força, motivação sempre que precisei e pela sua paciência. Também gostaria de agradecer a ajuda com a estatística.

Por último, gostaria de agradecer a todas as pessoas que aceitaram participar no estudo.

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tabelas	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. A enxaqueca	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Manifestações Clínicas	2
1.3 Aspetos gerais da fisiopatologia	4
Teoria vascular	4
Teoria neuronal	4
1.4 Sistema trigemino-vascular	6
1.4.1 CGRP e BDNF	7
1.5 Serotonina e recetores serotoninérgicos	9
1.6 Glutamato	10
1.7 Ácido gama-aminobutírico	10
1.8 Mecanismo desencadeantes	11
1.9 A Componente Genética da Enxaqueca	12
1.9.1 Estratégias de identificação de fatores de susceptibilidade	12
1.9.1.1 Identificação de mutações na FHM	13
1.9.1.2 Estudos de <i>linkage</i>	13
1.9.1.3 Estudos de associação	14
1.9.1.4 Estudos de associação Genome-Wide	16
1.9.1.5 Estudos de associação realizados em Portugal	17
1.10 Sintaxina	18
2. Objetivos do estudo	20
3. Sujeitos e Métodos	22
3.1 Amostragem	22
3.2 Genotipagem	23
3.2.1 Extração do DNA	23
3.2.2 PCR – RFLP	24
3.2.3 Sequenciação	28
3.3 Análise estatística	29

4. Resultados e Discussão	31
a) Frequências alélicas e genotípicas dos 3 SNPs na população açoriana	31
b) Análise da diversidade genética para os 3 SNPs analisados	33
c) Comparação das frequências alélicas e genotípicas entre as duas populações	34
d) Comparação com outras populações.....	37
e) Análise do grau de diferenciação genética entre as populações	43
f) Análise haplotípica	48
5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	50
6. Bibliografia	53

Índice de figuras

Figura 1: Sistema trigeminovascular – Percurso da dor na enxaqueca. O sistema trigeminovascular é ativado ocorrendo a libertação dos neuropéptidos, que levam à vasodilatação e sensibilização dos terminais nervosos nociceptivos, provocando a dor (Adaptado de Hargreaves, 1999)	7
Figura 2: Estrutura do gene <i>STX1A</i> com a posição relativa dos SNPs estudados (adaptado de Corominas <i>et al.</i> , 2009)	24
Figura 3: Genótipos possíveis para o polimorfismo rs941298 [C/T]	27
Figura 4: Genótipos possíveis para o polimorfismo rs6951030 [G/T]	27
Figura 5: <i>Plot</i> resultante da análise multidimensional baseada nos <i>FSTs</i> das diversas populações para o rs941298	45
Figura 6: <i>Plot</i> resultante da análise multidimensional baseada nos <i>FSTs</i> das diversas populações para o rs6951030	46
Figura 7: <i>Plot</i> resultante da análise multidimensional baseada nos <i>FSTs</i> das diversas populações para o rs3793243	47
Figura 8: Gráfico das frequências dos haplótipos na população de São Miguel e Portugal Continental	48

Índice de tabelas

Tabela 1: Questionário com os critérios de inclusão e exclusão no estudo	22
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação	24
Tabela 3: Preparação da reação de digestão enzimática do rs941298	25
Tabela 4: Preparação da reação de digestão enzimática do rs6951030	26
Tabela 5: Sequência de reconhecimento da enzima <i>HpyAV</i> e <i>Bse (BsaJI)</i>	26
Tabela 6: Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs em estudo	32
Tabela 7: Genótipos observados e esperados, e análise do equilíbrio de HW	33
Tabela 8: Valores de diversidade genética para os 3 SNPs em estudo	33
Tabela 9: Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs em estudo nos indivíduos do presente estudo e do estudo de Lemos <i>et al.</i> , 2010	35
Tabela 10: Comparação das frequências alélicas dos SNPs entre a amostra em estudo e outras populações	38
Tabela 11: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o rs941298, nível significância=0,0500	39
Tabela 12: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o rs6951030, nível significância=0,0500	40
Tabela 13: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o r s3793243, nível significância=0,0500	41
Tabela 14: Valores de distância genética (<i>FST</i>) para os rs941298, rs6951030 e rs3793243, entre a amostra estudada (amostra do presente estudo) e as restantes populações utilizadas nas comparações	44

Abreviaturas

5-HIAA - ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT – serotonina

5HT2C – recetor 2C da serotonina

5-HTR – recetores de serotonina

5-HTT - transportador de serotonina

AMPA - ácido a-amino-3hidróxi-5- metilisoxazole-4-propriônico

ATP1A2 - Na⁺-K⁺ ATPase

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

CACNA1A – “calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit”

CGRP - peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

DCA - depressão cortical alastrante de Leão

EDNRA - recetor A da endotelina

FHM - enxaqueca hemiplégica familiar

GABA - ácido gama-aminobutírico

GABRA – recetor 3 do GABA-A

GABRE – recetor GABA-A do tipo épsilon

GABRQ – recetor teta do GABA

GRIA3 - recetor ionotrópico AMPA3 do glutamato

GWAs - genome wide association

HCRTR1 - gene do recetor 1 da hipocretina

INSR – recetor da insulina

LCA - “latent class analysis”

LDLR – recetor da lipoproteína de baixa densidade

LRP1 - “Low density lipoprotein receptor-related protein 1”

MA - enxaqueca com aura

MO - enxaqueca sem aura

MTDH - Metaderina

MTHFR C677T - 5,10 metilene-tetra-hidrofolato redutase

NKA - neuroquinina A

NMDA - N-metil-D-aspartato

NOTCH3 - recetor Notch3

OMS - Organização Mundial de Saúde

PGCP - plasma glutamato carboxipeptidase

PRDM16 - “PR domain containing 16”

RFLP - Restiction Fragment Lenght Polymorphism

SCN1A – “voltage-gated sodium channel”

SNARE - “soluble N-ethylmaleimide- sensitive factor attachment protein receptor”

SP - substância P

STV - sistema trigemino-vascular

TCA - “trait component analysis”

TPH - triptofano hidroxilase

TRPM8 - “Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8”

Resumo

A enxaqueca é uma doença multifatorial, que resulta de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais, apresentando dois principais subtipos, a enxaqueca com e sem aura. A causa exata da enxaqueca é ainda desconhecida, mas já está estabelecido que fatores genéticos estão na sua base. A natureza complexa da doença faz com que poucos genes de susceptibilidade tenham sido identificados e replicados de forma consistente. O gene *STX1A* é responsável pela produção da proteína sintaxina 1A. Esta proteína regula a libertação dos neurotransmissores no sistema nervoso central e interage com o transportador da serotonina. A serotonina influencia quase todas as funções cerebrais, incluindo a estimulação do ácido gama-aminobutírico. Alguns recetores agonistas do ácido gama-aminobutírico são utilizados na profilaxia da enxaqueca. A investigação realizada consistiu na replicação de parte de um estudo empreendido na população de Portugal Continental, no qual se associaram à enxaqueca vários *tagging* SNPs do gene *STX1A* (Lemos *et al.*, 2010). A amostra analisada no estudo foi constituída por 103 indivíduos, sem enxaqueca, da ilha de São Miguel- Açores. Analisaram-se, por PCR-RFLP e sequenciação, 3 SNPs (rs941298, rs6951030 e rs3793243) do gene *STX1A*. Os alelos mais frequentes para o rs941298 e para o rs6951030 são os mesmos da população do Norte de Portugal (C e T). Para o rs3793243 constatou-se que o alelo mais frequente na população açoriana é o T e na população continental é o alelo C. Para os rs941298 e rs6951030 a frequência dos alelos de risco T e G, em São Miguel é bastante semelhante à frequência destes mesmos alelos na população de Portugal Continental. As frequências genotípicas obtidas para os rs941298,rs6951030 e rs3793243 foram 49,5%, 56,3% e 54,5%, respetivamente. As frequências genotípicas estavam em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Heinberg. Os valores de diversidade genética obtidos para os 3 SNPs variaram entre 0,172 e 0,454. O haplótipo C-C-T foi o mais frequente na ilha de São Miguel, sendo o haplótipo T-T-T o que apresenta uma maior frequência na população de Portugal Continental. O haplótipo C-T-G foi o menos frequente em ambas as populações. Uma vez que o perfil alélico e genotípico dos indivíduos sem enxaqueca foi muito semelhante em São Miguel e Portugal Continental, comprovasse a homogeneidade entre estas duas populações. Assim, é possível concluir com este trabalho que a amostra selecionada de indivíduos sem enxaqueca, pode vir a ser utilizada como amostra controlo. A semelhança entre esta amostra e a de Portugal Continental permitirá, no futuro, prosseguir a investigação sobre a enxaqueca, incluindo a replicação do estudo de Lemos *et al.* (2010) com o gene *STX1A*.

Abstract

Migraine is a multifactorial disease that results from complex interactions between genetic and environmental factors, presenting two main subtypes, migraine with and without aura. The exact cause of migraine is unknown, but an important role of genetic factors is already established. The complex nature of the disease implies that a reduced number of susceptibility genes has been identified and consistently replicated. The *STX1A* gene encodes for the protein syntaxin 1A. This protein regulates the release of neurotransmitters in the central nervous system and interacts with the serotonin transporter. Serotonin influences many brain functions, including the stimulation of gamma-aminobutyric acid. Some agonists receptors of the gamma-aminobutyric acid are used in the prophylaxis of migraine. The present work consisted in the replication of part of a study undertaken in the Portuguese Mainland population, in which *tagging* SNPs of the *STX1A* gene were associated with migraine gene (Lemos *et al.*, 2010). One-hundred and three individuals without migraine, born in the island of São Miguel-Azores were included in the study. Three SNPs of the *STX1A* gene (rs941298, rs6951030 and rs379324) were analyzed by PCR-RFLP and sequencing. For the rs941298 and rs6951030 the most frequent alleles were the same as those found in Mainland Portugal (C and T). The most frequent allele for rs3793243 in the Azorean population was T, whereas in the continental population it was allele C. For the polymorphisms rs941298 and rs6951030 the frequency of the risk alleles T and G is very similar in San Miguel comparatively to the frequency of these same alleles in the population of mainland Portugal. The genotypic frequencies for obtained for rs941298, rs6951030 and rs3793243 were 49.5%, 56.3% and 54.5%, respectively. Genotype frequencies were in conformity with Hardy-Weinberg expectations. The values obtained for genetic diversity for the 3SNPs varied between 0.172 and 0.454. The most frequent haplotype in the Azorean sample was C-C-T, whereas the T-T-T haplotype showed a higher frequency in the population of continental Portugal. The C-T-G haplotype was the least frequent in both populations. Since the allelic and genotypic profile of the individuals without migraine was very similar between the Azorean sample analyzed and mainland Portugal, it was possible to show the homogeneity between the two populations. Therefore, we conclude that the sample of individuals without migraine analyzed in this study can be used as controls for future work, including the replication of the study of Lemos *et al.* (2010) with the gene *STX1A*.

A enxaqueca

1. A enxaqueca

A enxaqueca é uma das doenças neurológicas mais comuns, com um grande impacto social e económico (Anttila *et al.*, 2010). Esta patologia é caracterizada por uma dor de cabeça intensa e pulsátil, que pode ser muitas vezes acompanhada por náuseas, vômitos, intolerância à luz e ao ruído (Menon *et al.*, 2011; Rainero *et al.*, 2011).

A enxaqueca é uma doença multifatorial, resultado de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais, que apresenta fenótipos clínicos variáveis associados com a expressão da doença. A natureza complexa da doença faz com que poucos genes ou *loci* de suscetibilidade tenham sido identificados e replicados de forma consistente para confirmar o seu envolvimento com a enxaqueca. Atualmente têm sido realizados vários estudos de modo a identificar as variantes genéticas que podem alterar as funções dos genes envolvidos na enxaqueca (Maher & Griffiths, 2011). Estudos de *linkage* e de associação têm permitido a identificação de um maior número de *loci* de susceptibilidade. Na população portuguesa foi recentemente confirmado o envolvimento da proteína syntaxina 1A na susceptibilidade da enxaqueca (Lemos *et al.*, 2010). A syntaxina 1A, codificada pelo gene *STX1A* (Lemos *et al.*, 2010) interage com o transportador pré-sináptico da serotonina, que leva a alterações na sua localização subcelular e provoca uma redução na recaptção da serotonina (Corominas *et al.*, 2009). A serotonina influencia quase todas as funções cerebrais, estimulando ou inibindo o ácido gama-aminobutírico (GABA), desempenhando ambos os neurotransmissores um papel fundamental na fisiopatologia da enxaqueca. (Fernandez *et al.*, 2008).

1.1 Epidemiologia

A enxaqueca é uma doença neurológica caracterizada por episódios recorrentes de dores de cabeça (Rainero *et al.*, 2011), estando vários mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Em geral, a enxaqueca é considerada uma doença comum que atinge cerca de 15% da população mundial (Stovner *et al.*, 2006). Na Europa, esta patologia afeta cerca de 18% das mulheres e 6% dos homens (Stovner *et al.*, 2006). Em Portugal, a sua prevalência é estimada em 16,7% (Lemos *et al.*, 2009).

As manifestações da enxaqueca podem surgir desde muito cedo, na infância ou juventude. A sua prevalência aumenta rapidamente a partir da adolescência atingindo o seu máximo na fase produtiva e reprodutiva (Fukui *et al.*, 2008). As mulheres são as mais

afetadas por esta patologia, com valores de prevalência entre os 15-25%, enquanto a prevalência nos homens é cerca de 6-8% (Scher *et al.*, 1998). Estudos de prevalência da enxaqueca em Portugal foram já também realizados. No ano de 1992, foi realizado um estudo com uma população estudantil universitária que demonstrou uma prevalência de enxaqueca de 12,1% (6,1% - enxaqueca isolada e 6% associada a outras formas de cefaleias) (Monteiro *et al.*, 1993). O estudo populacional realizado por Monteiro apresentou uma prevalência da enxaqueca ao longo da vida de 16,2% - 8,8% na forma pura e 12,1% associada a outros tipos de cefaleias, essencialmente com cefaleias de tensão (Monteiro, 1995).

Apesar de não ser considerada uma causa de morte, as crises de enxaqueca podem ser muito incapacitantes, pelo que o estudo desta doença debilitante foi ganhando cada vez mais importância, quer pelo sofrimento individual e familiar quer pelo prejuízo económico direto, na procura de médicos e compra de medicamentos, e indireto pela diminuição da produtividade e absentismo (Brandes, 2009).

No ranking da Organização Mundial de Saúde (OMS) a enxaqueca encontra-se na 19ª posição entre todas as doenças causadoras de incapacidade (Pereira *et al.*, 2005), sendo considerada a doença neurológica mais dispendiosa para a sociedade, com um impacto considerável na saúde pública (Anttila *et al.*, 2010). Ao longo dos tempos tem-se verificado um aumento da prevalência de certas doenças crónicas relacionadas diretamente com a enxaqueca, ou seja, patologias significativamente mais frequentes em pessoas que sofrem de enxaqueca do que na população geral. Pode-se destacar, por exemplo, as doenças vasculares cerebrais, cardiovasculares (Trauninger *et al.*, 2011), perturbações da ansiedade (Kowacs *et al.*, 2003), depressão e epilepsia (Breslau *et al.*, 2000).

1.2 Manifestações Clínicas

Segundo a “International Headache Society”, a enxaqueca é classificada em dois principais subtipos: enxaqueca sem aura (MO) e enxaqueca com aura (MA) (Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, 2004). Os dois subtipos apresentam sintomas semelhantes, mas a MA é também caracterizada por perturbações neurológicas transitórias – denominadas por aura. A MO é caracterizada por uma dor de cabeça moderada a intensa, unilateral e pulsátil. As crises da MO podem durar de 4-72 horas sendo, agravadas pela atividade física e podem ser acompanhadas por outros sintomas, como por exemplo, náuseas, intolerância à luz (fotofobia) e ao ruído (fonofobia).

Na MA ocorrem alterações que se manifestam em sintomas neurológicos focais reversíveis que se desenvolvem num período de tempo entre 5-20 minutos não durando mais do que uma hora (Pereira *et al.*, 2005). Os distúrbios neurológicos transitórios podem surgir antes ou no início da dor de cabeça, e são caracterizados por uma deficiência visual ou outras alterações sensoriais que antecedem a enxaqueca (Lipton *et al.*, 2004). As dores de cabeça que apresentam as características da MO geralmente aparecem depois da aura (Pereira *et al.*, 2005). Num terço da população de indivíduos com enxaqueca, as crises são precedidas de aura. As crises de aura são maioritariamente visuais, mas também podem ocorrer distúrbios sensoriais, perturbações da linguagem e sintomas motores (Lipton *et al.*, 2004). Como os dois sub-tipos mais comuns da enxaqueca se diferenciam principalmente pela presença/ausência da aura, os doentes com enxaqueca podem sofrer episódios apenas de MA ou MO, ou então uma combinação dos dois tipos, em proporções variáveis (Anttila *et al.*, 2010).

Ainda dentro da MA existe uma forma rara e grave de enxaqueca, a enxaqueca hemiplégica familiar (FHM). A FHM é transmitida com um padrão de hereditariedade autossómico dominante (Pietrobon, 2007) apresentando como sintomas neurológicos perturbações visuais, perda sensorial, disfasia e hemiparese. Os défices neurológicos dos episódios de FHM podem prolongar-se por várias horas e dias (Pereira *et al.*, 2005).

Em geral, os episódios de enxaqueca são caracterizados por 5 fases distintas: pródromo, aura, dor de cabeça, resolução e pós-dromo. A primeira fase – pródromo, consiste na perceção de manifestações que podem anteceder a enxaqueca em horas ou dias. Esta fase parece estar envolvida na alteração do equilíbrio neuroquímico do sistema nervoso central (Blau, 1987). A aura, segunda fase, só ocorre em indivíduos com MA (Cady *et al.*, 2000). A terceira fase, a dor de cabeça, é caracterizada por uma dor de cabeça moderada ou intensa, pulsátil e unilateral. O mecanismo subjacente à fase de resolução ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, é nesta fase que ocorre a diminuição da transmissão da serotonina e dos estímulos sensoriais. Por último na fase de pós-dromo já não existem sinais de dor, mas mantêm-se ainda as queixas cognitivas e a intolerância aos estímulos (Blau, 1987).

1.3 Aspectos gerais da fisiopatologia

Apesar da fisiopatogenia da enxaqueca não ser conhecida em todos os seus aspectos, foram já propostas várias teorias. No passado, as duas hipóteses que surgiram para explicar a patofisiologia da enxaqueca foram a teoria vascular e a neuronal. Atualmente, a teoria neurovascular é a mais consensual, relacionando a depressão cortical alastrante e a ocorrência de vasodilatação dos vasos sanguíneos responsáveis pela ativação do sistema trigemino-vascular (Machado *et al.*, 2006).

Teoria vascular:

A teoria vascular baseia-se na isquemia focal como causadora da aura. A aura ocorre devido à hipoperfusão secundária da vasoconstrição do vaso sanguíneo responsável pela irrigação da área cortical correspondente ao sintoma da aura. A vasodilatação reativa explicaria a génese da dor através da estimulação das fibras perivasculares sensíveis à dor. Esta teoria explicaria também a natureza pulsátil da enxaqueca, o alívio proporcionado pelos vasoconstritores e o desencadeamento da dor através das substâncias vasoativas (Machado *et al.*, 2006).

Porém, a explicação para estes fatos parece surgir de uma enervação somatossensorial densa das veias intracranianas. Este conceito é baseado em fatos como: o peptídeo intestinal vasoativo - um poderoso vasodilatador intracraniano (Rahmann *et al.*, 2008), fármacos não vasoconstritores, como o ácido acetilsalicílico (Lampl *et al.*, 2007) e antagonistas dos recetores do peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, que parecem ser responsáveis pelo alívio das crises de enxaqueca (Olesen *et al.*, 2004).

Teoria neuronal:

A teoria neuronal baseia-se no fenómeno chamado de depressão cortical alastrante de Leão (DCA) (Leao, 1944), que defende que as alterações no débito sanguíneo se desenvolvem como consequência de eventos neuronais. Durante a crise, ocorre uma pequena fase de hiperperfusão seguida de hipoperfusão, que corresponde à DCA (Machado *et al.*, 2006). A DCA é caracterizada por uma onda de curta duração e de intensa despolarização neuronal e glial, que se propaga através de áreas contíguas do córtex cerebral a uma taxa de 2-5mm/min, sem ter em conta as divisões corticais ou os territórios arteriais, acompanhada por um fluxo massivo de iões (Ca^{2+} , Na^+ e K^+). Segue-se uma

inibição de longa duração da atividade neuronal espontânea e evocada (Vries *et al.*, 2009). Esta inibição ocorre quando as concentrações extracelulares de K^+ aumentam acima de um limite geneticamente determinado, presumindo-se que o limite para o início da DCA é inferior nos doentes com enxaqueca relativamente à população normal (Eikermann-Haerter & Ayata, 2010).

A sensibilização periférica dos neurónios trigemino-vasculares coordena a dor pulsátil e o seu agravamento pela inclinação anterior da cabeça; a sensibilização central dos neurónios trigemino-vasculares no núcleo *caudalis* medeia a hipersensibilidade do couro cabeludo e pele peri-orbitária. A ativação trigemino-vascular ocorre secundariamente a um fator iniciador da crise de enxaqueca. Estruturas do tronco, do córtex ou uma disfunção neuroquímica poderão ter um papel importante na génese da enxaqueca, na sua modulação ou em ambas. Aparentemente, o cérebro das pessoas com enxaqueca é mais hiperexcitável em relação a pessoas sem enxaqueca. A ativação do tronco cerebral durante uma crise de enxaqueca não é uma resposta à dor de cabeça, mas é o responsável pela sintomatologia da enxaqueca. As pessoas com enxaqueca podem ter hipersensibilidade central à estimulação dopaminérgica, estando este fato relacionado com certos comportamentos observados durante a crise de enxaqueca, como o bocejar, irritabilidade, hiperatividade, gastroparésia, náuseas e vômitos (Machado *et al.*, 2006).

Atualmente, pensa-se que a MA é causada pela DCA. Estudos de neuro-imagem funcional indicaram que alterações no fluxo sanguíneo cerebral, ocorrendo durante a aura, são muito semelhantes àsquelas observadas nos estudos em animais durante a DCA. Os estudos em animais foram decisivos para mostrar que a DCA pode ativar o sistema trigemino-vascular e que pode, portanto, desencadear a dor de cabeça por ativação dos seus mecanismos (Buzzi & Moskowitz, 2005). Por sua vez, na MO o fluxo sanguíneo cerebral não apresenta alterações significativas na DCA. Tal fato foi demonstrado através de estudos recentes realizados em pacientes com MO. Estes estudos revelaram que a DCA pode ocorrer em áreas silenciosas do cérebro, ocorrendo a dor mas não os sintomas associados à aura (Sanchez-Del-Rio *et al.*, 2006).

A **teoria neurovascular** foca-se na ocorrência da DCA. No entanto, esta também aceita os fenómenos vasculares e a inflamação neurogénica que ocorrem durante os episódios de enxaqueca. Durante as crises de enxaqueca as fibras sensitivas libertam substâncias como a substância P (SP), CGRP (peptídeo relacionado com o gene da calcitonina) e neuroquinina A (NKA) que provocam uma resposta inflamatória causando a

sensibilização das fibras nervosas a estímulos. Assim sendo, a sensibilização periférica dos neurónios trigemino-vascular é responsável pela mediação da dor (Machado *et al.*, 2006).

1.4 Sistema trigemino-vascular:

O sistema trigemino-vascular (STV) é constituído pela meninge cortical e superficial dos vasos sanguíneos inervados pelo nervo trigeminal. O STV está diretamente implicado no processo da dor de cabeça constituindo assim, o seu suporte anatómico (Pietrobon & Striessnig, 2003). Acredita-se que a dor é resultado de um processo inflamatório neurogénico, produzido pela libertação dos neuropeptídeos das terminações nervosas trigeminais, associado à libertação de outras substâncias algícas (substâncias que provocam a dor). A libertação destes neuropeptídeos e componentes algícos induzem a vasodilatação e o extravasamento das proteínas plasmáticas, sensibilizando os terminais nervosos nociceptivos (Limnroth *et al.*, 1996) (Figura 1).

Diversos estudos realizados têm demonstrado a relação existente entre a inflamação neurogénica e a enxaqueca. As hipóteses atuais sobre a enxaqueca permitem concluir que a inflamação neurogénica é responsável pela disfunção cerebral primária desencadeando a dilatação dos vasos sanguíneos cranianos enervados por fibras sensoriais. Quando os vasos sanguíneos sofrem dilatação, automaticamente ocorre a ativação dos nervos sensoriais trigeminais perivascularares responsável pela dor, resultando na libertação de substâncias vasoativas, como CGRP e SP a partir das fibras trigeminais (Durham, 2006).

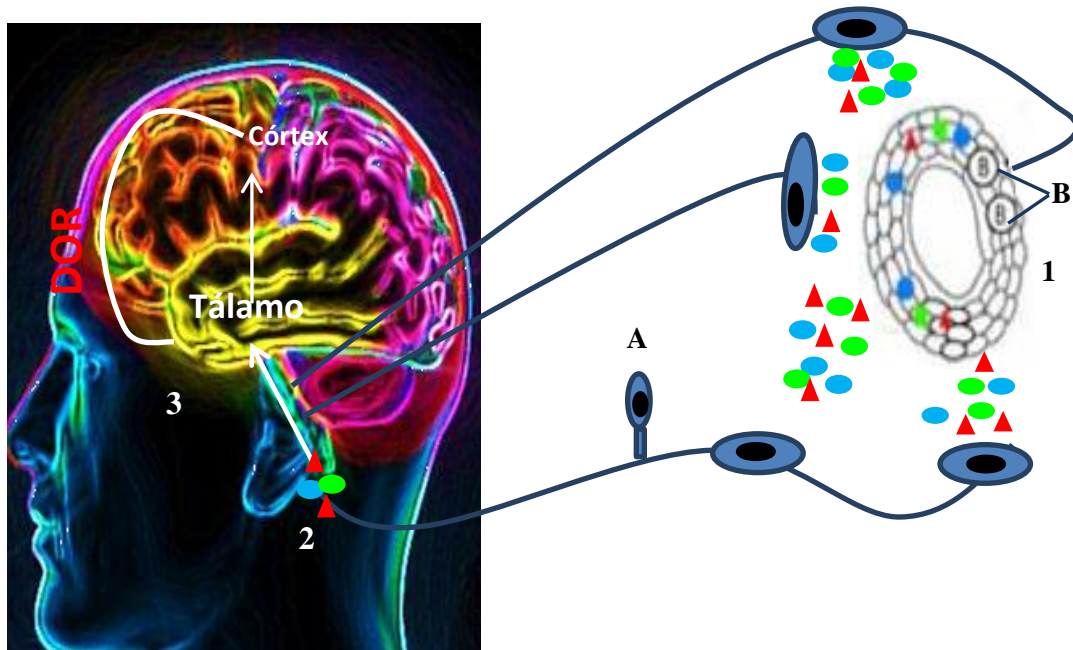


Figura 1: Sistema trigemino-vascular – Percurso da dor na enxaqueca. O sistema trigemino-vascular é ativado ocorrendo a libertação dos neuropeptídeos, que levam à vasodilatação e sensibilização dos terminais nervosos nociceptivos, provocando a dor (Adaptado de Hargreaves & Shephard, 1999).

Legenda: Substâncias vasoativas: ▲ neuroquinina A, ● CGRP, ● Substância P. A - Gânglio trigeminal, B – recetores 5-HT_{1B}, 1– Vasodilatação, 2 – Transmissão da dor, 3 – Transmissão central da dor

1.4.1 CGRP e BDNF

No STV os corpos celulares do gânglio trigeminal constituem a principal fonte do CGRP (Shankland, 2000). O CGRP é considerado um potente vasodilatador existente nos neurónios sensoriais e nas terminações nervosas perivasculares do sistema nervoso central (Levy *et al.*, 2005) desempenhando um importante papel na transmissão da informação nociceptiva (Goadsby, 2007). O aumento dos níveis de CGRP no STV provoca a ativação dos neurónios e portanto, a transmissão da dor (Striessnig, 2005). Existem várias evidências do papel do CGRP na enxaqueca, nomeadamente: o fato das concentrações séricas de CGRP, durante as crises de enxaqueca, serem elevadas; o alívio da dor de cabeça através do uso de triptofanos, considerados a classe de fármacos anti-enxaqueca mais eficaz, que coincide com a redução das concentrações de CGRP no sangue. Os antagonistas dos recetores do CGRP constituem outra evidência do seu papel na fisiopatologia da enxaqueca, pois são responsáveis pela redução da vasodilatação e da inflamação neurogénica, conferindo um benefício clínico na enxaqueca (Doods *et al.*, 2000).

O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) é considerado a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzido principalmente pela glia e pelos núcleos neuronais (Shimizu *et al.*, 2003). O BDNF está presente em grande quantidade no tecido cerebral e periférico e encontra-se nos neurónios e plaquetas, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Karege, 2002; Duffau, 2006). Esta neurotrofina desempenha diversas funções sinápticas como o crescimento celular, conectividade sináptica, diferenciação e reparação neuronal (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Além disso, encontra-se envolvida na expressão dos diferentes neurotransmissores (Karege, 2002). Em relação ao BDNF, existem várias evidências quanto ao seu papel a longo prazo na plasticidade sináptica. A aplicação do BDNF realça a eficácia pré-sináptica, aumentando a libertação do glutamato nas sinapses excitatórias (Lessmann *et al.*, 2003).

O BDNF atua como o principal modulador da dor, contribuindo para a sensibilização central e modulando a ação do NMDA (N-metil-D-aspartato) (Thompson *et al.*, 1999). Um dos mecanismos envolvidos na enxaqueca corresponde à sensibilização central representada pela atividade das alterações da plasticidade dos neurónios trigeminais (Pietrobon, 2005). Portanto, o BDNF tem sido indicado como um mediador da plasticidade nociceptiva trigeminal (Buldyrev *et al.*, 2006). A diminuição significativa dos níveis de BDNF a nível plaquetário em indivíduos com enxaqueca veio demonstrar o papel do BDNF na fisiopatologia da enxaqueca (Blandini *et al.*, 2006). Como referido anteriormente, a DCA está implicada na fisiopatologia da enxaqueca, principalmente na MA (Buzzi & Moskowitz, 2005). Um estudo de Urbach *et al.* (2006) debruçou-se sobre os diferentes genes expressos após a DCA e neste estudo foi possível verificar que o gene *BDNF* era um desses genes.

Nos gânglios dos neurónios de ratos foi observado que o CGRP é co-expresso com o BDNF. O CGRP aumenta a libertação do BDNF e é abolido pelo antagonista do recetor-CGRP. Por sua vez, a libertação do BDNF surge pela estimulação elétrica dos processos fisiológicos sendo independente do cálcio extracelular. Assim sendo, o CGRP apresenta um papel ainda desconhecido na regulação da disponibilidade do BDNF, enquanto o BDNF é considerado um candidato na plasticidade nociceptiva trigeminal (Buldyrev *et al.*, 2006).

1.5 Serotonina e recetores serotoninérgicos

A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina ou 5-HT é um neurotransmissor, sendo secretada por neurónios serotoninérgicos e atuando em recetores de neurónios pós-sinápticos, desempenhando funções importantes no sistema nervoso, tais como na libertação de hormonas, regulação do sono, temperatura corporal, apetite, humor, atividade motora e funções cognitivas, devido ao seu efeito inibidor e modulador (Lam & Heisler, 2007). Assim, a 5-HT é importante na regulação da constrição vascular cerebral, na libertação de neurotransmissores e na agregação plaquetária (Naito *et al.*, 2010).

A 5-HT produzida é armazenada nas vesículas pré-sinápticas nos terminais dos axónios, sendo posteriormente libertada na fenda sináptica. É na fenda sináptica que a serotonina alcança os seus recetores - 5-HTR, concluindo a sinapse. No entanto, a 5-HT que não chega aos recetores é direcionada para os neurónios pré-sinápticos pelo transportador de serotonina, 5-HTT (Romeiro *et al.*, 2003).

O envolvimento da 5-HT na enxaqueca foi demonstrado por Sicuteri, em 1961, ao observar que a urina de doentes com enxaqueca continha uma maior quantidade de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), principal metabolito da 5-HT (Ferrari & Saxena, 1993). Também foi demonstrado que os níveis de serotonina plaquetária aumentavam rapidamente no início dos episódios de enxaqueca e que a aplicação intravenosa de serotonina interrompia a dor de cabeça (Goadsby, 2000).

A serotonina apresenta um vasto conjunto de recetores que são responsáveis pela transmissão do sinal do neurotransmissor da 5-HT. Os recetores da serotonina estão divididos em 7 famílias. A família 1 encontra-se subdividida em 5 sub-grupos (A, B, D, E e F) e são estes os mais importantes no bloqueio das crises de enxaqueca (Hannon & Hoyer, 2008). A caracterização dos recetores da serotonina permitiu melhorar o conhecimento sobre a patogénese e tratamento da enxaqueca. Podemos destacar os recetores 5-HT_{1B} presente no músculo liso vascular, 5-HT_{1D} nas fibras trigeminais sensitivas e o 5-HT_{1F} localizado no núcleo trigeminal caudal e perifericamente no gânglio trigeminal. A estimulação dos recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} impede a libertação do péptido vasoativo CGRP e a transmissão da dor pela SP e pela NKA inibindo a dor de cabeça (Salomone *et al.*, 2009). Agonistas dos recetores da serotonina têm sido utilizados na terapêutica para reduzir os episódios de enxaqueca (Maher & Griffiths, 2011).

1.6 Glutamato

O glutamato desempenha um papel importante na neurotransmissão aferente primária e na nocicepção (percepção da dor), estando assim envolvido nos mecanismos da enxaqueca (Fejes *et al.*, 2011). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (Tajti *et al.*, 2011) e ativa os recetores ionotrópicos (associados a canais de iões) e metabotrópicos (acoplados à proteína G). Este aminoácido é sintetizado nos terminais pré-sinápticos a partir da glutamina, por ação da enzima glutaminase, podendo também ser originado a partir do α -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase e α -cetoglutarato aminotransferases (Goadsby *et al.*, 2009).

Os recetores do glutamato parecem também estar associados à hiperalgesia provocando o aumento da dor induzida através dos estímulos nociceptivos (Salomone *et al.*, 2009). Recentemente, o glutamato é considerado como crucial na fisiopatologia da enxaqueca (Tajti *et al.*, 2011). O MK-801, antagonista do recetor NMDA, tal como o GYKI-52466, antagonista do AMPA (ácido α -amino-3hidróxi-5- metilisoxazole-4-propiónico) desempenham um importante papel na enxaqueca uma vez que, a sua ação permite o bloqueio dos neurónios nociceptivos no sistema trigémino-vascular. Assim, o glutamato pode continuar a ser utilizado como um candidato na profilaxia da enxaqueca e a ser alvo de estudo na sua terapêutica (Goadsby *et al.*, 2009).

1.7 Ácido gama-aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central é libertado através dos terminais pré-sinápticos pela fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática. Depois da fusão com a membrana, o GABA é libertado através das vesículas sinápticas para as fendas sinápticas onde se vai ligar aos recetores pós-sinápticos do GABA permitindo assim, a transmissão dos sinais para os terminais pós-sinápticos (Fan *et al.*, 2006). A atuação do GABA ocorre principalmente pela sua ligação com os recetores de GABA. Existem dois tipos de recetores, recetores ionotrópicos, GABA-A e os recetores metabotrópico GABA-B (Fernandez *et al.*, 2008). Os recetores do GABA com atividade inibidora desenvolvem um papel importante no processo de inflamação neurogénica. Tal fato tem sido demonstrado em experiências com modelos animais recorrendo ao uso do valproato, um fármaco anticonvulsivo usado no tratamento preventivo da enxaqueca. Presentemente, outros anticonvulsivos têm sido utilizados com

sucesso tais como a gabapentina, lamotrigina, tiagabina, topiramato. O valproato atua nos mecanismos de ação dos recetores GABA-A, localizados nos neurónios sensoriais trigeminais. Os recetores GABA-B também estão ligados à fisiopatologia da enxaqueca estando envolvidos na libertação dos neurotransmissores. O baclofeno, um agonista do GABA-B, pode atuar sobre os mecanismos anteriormente referidos levando à libertação de muitos neurotransmissores dos quais o GABA faz parte (Salomone *et al.*, 2009).

1.8 Mecanismo desencadeantes

Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na etiologia da enxaqueca. Os fatores genéticos têm sido considerados como os principais fatores envolvidos no aumento da suscetibilidade das crises de enxaqueca. No entanto, a enxaqueca engloba uma diversidade de mecanismos patofisiológicos inter-relacionados entre si. Identificar os fatores desencadeantes desta patologia é muito importante, pois pode ajudar a prevenir esta doença, tendo sido realizados já vários estudos sobre estes fatores. Estes estudos têm sido concordantes entre si, destacando-se os seguintes fatores (Fukui *et al.*, 2008):

- ❖ Dieta – chocolate, monóxido de glutamato;
- ❖ Fadiga;
- ❖ Fatores hormonais – menstruação, gravidez;
- ❖ Transtornos de sono – falta de sono;
- ❖ Stress;
- ❖ Atividades que implicam esforços – física, sexual;
- ❖ Fatores ambientais – poluição, chuva, vento, sol, perfumes, cigarro, entre outros.

Atualmente, têm sido realizados vários estudos de modo a identificar as variantes genéticas que podem alterar as funções dos genes envolvidos na enxaqueca (Maher & Griffiths, 2011).

1.9 A Componente Genética da Enxaqueca

Tal como anteriormente referido, a enxaqueca é uma doença multifatorial, resultado de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais (Maher & Griffiths, 2011).

Estudos realizados em famílias com enxaqueca sugerem que esta patologia apresenta uma componente hereditária. No estudo de Russell e Olesen (1995) verificou-se que os familiares em primeiro grau dos indivíduos estudados, com MA, apresentavam um risco aproximadamente quatro vezes superior de virem a sofrer também de MA, mas não de MO. Em comparação com a população geral, os familiares em primeiro grau dos indivíduos que sofriam de MO apresentavam um risco 1,9 vezes mais elevado de virem a sofrer de MO e um risco de 1,4 vezes de sofrer de MA.

Em Portugal, o estudo de Lemos *et al.* (2009) teve como objetivo avaliar a agregação familiar numa vasta amostra de famílias portuguesas. Neste estudo foi avaliado se a agregação familiar na MO e MA era diferente. Ao todo foram avaliadas 483 pessoas afetadas pela doença e os seus familiares em primeiro grau. O estudo permitiu comprovar que existe uma agregação familiar muito significativa dos dois tipos de enxaqueca (com e sem aura). Este trabalho demonstrou também que os familiares diretos dos indivíduos que sofrem de enxaqueca são entre três e quatro vezes mais suscetíveis de ter esta doença.

1.9.1 Estratégias de identificação de fatores de susceptibilidade

Para identificar os fatores que interferem na susceptibilidade da enxaqueca são utilizadas várias estratégias. Em primeiro lugar podemos destacar a análise de *linkage*, que identifica regiões de cromossomas partilhadas por indivíduos afetados de uma mesma família (Maher & Griffiths, 2011; Schürks, 2012). Em segundo lugar os estudos de associação caso-controlo comparam a frequência de variantes polimórficas em genes candidatos entre uma população afetada (casos) e não afetada (controles) (Cardon & Palmer, 2003). A maioria dos estudos realizados incluiu genes envolvidos nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, mas também outros genes suspeitos de estarem envolvidos na fisiopatologia da enxaqueca. No entanto, a maioria das associações não é replicável, sugerindo que muitos dos achados originais representam falsos positivos, havendo vários motivos para as incongruências (Vries *et al.*, 2009). Por último podemos destacar os estudos de *genome wide association* (GWAs), que utilizam marcadores espalhados ao longo do genoma. Recentemente, os estudos de GWAs permitiram um

grande desenvolvimento na área genética, possibilitando a análise de inúmeras variantes de DNA. Os GWAs no entanto não conseguem elucidar completamente a genética da enxaqueca pois, as variantes genéticas mais comuns parecem explicar apenas uma parte da variação genética nesta doença, estando envolvidas também variantes raras (Maher & Griffiths, 2011; Schürks, 2012).

1.9.1.1 Identificação de mutações na FHM

A primeira mutação genética relacionada com a enxaqueca foi descoberta na FHM. Os estudos de *linkage* em famílias com FHM têm permitido identificar diversas variantes genéticas. Já foram descritas mutações em 3 genes responsáveis pela FHM (Maher & Griffiths, 2011). O primeiro gene a ser identificado foi o *CACNA1A* (“calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit”), na FHM1, o qual se encontra no cromossoma 19p13 (Ophoff *et al.*, 1996). Na FHM2 foi identificado o segundo gene designado por *ATP1A2* (“Na⁺-K⁺ ATPase”), localizado no cromossoma 1q23 (De Fusco *et al.*, 2003). Por último, o gene mais recentemente identificado foi o *SCN1A* (“voltage-gated sodium channel”) na FHM3, localizado no cromossoma 2q24 (Dichgans *et al.*, 2005). As mutações presentes nos genes referidos não têm sido encontradas na MA e MO. Contudo, e visto que os genes *CACNA1A*, *ATP1A2* e *SCN1A* estão relacionados com o transporte iônico, a descoberta dessas mutações sugere que as alterações iônicas podem desempenhar um papel na patogênese das formas mais comuns da enxaqueca (Tropeano *et al.*, 2012).

1.9.1.2 Estudos de *linkage*

Na enxaqueca, os estudos de *linkage* efetuados têm permitido um aumento do número de *loci* de susceptibilidade identificados (Anttila *et al.*, 2008). Diversas regiões já foram descritas em diferentes populações para os dois subtipos mais comuns, como por exemplo, as regiões 1q3, 4q21, 4q24, 6p12.2-p21., 11q24 e 14q21.2-q22. Outros exemplos são as regiões 19p13 e 10q25 (Maher & Griffiths, 2011).

A região 15q11-13 também foi estudada através de estudos *linkage*, onde estão localizados genes que codificam as sub-unidades GABRB3, GABRA5 e GABRG3 do GABA-A (Russo *et al.*, 2005). Outra região a destacar é a 9q21-q22, onde um *locus* para a MA foi mapeado. Esta região tem sido associada à epilepsia do lobo occipito-temporal, o

que tem demonstrado a existência de mecanismos moleculares comuns entre a epilepsia e a enxaqueca (Tikka-Kleemola *et al.*, 2010).

Nyholt *et al.* (1998; 2000) analisaram famílias australianas e sugeriram que a região Xq24-28 estava implicada na susceptibilidade da enxaqueca. Esta região contém vários genes candidatos envolvidos na função e regulação da serotonina, tais como os genes *5-HT1B*, *5-HT1D* e *5HT2C* - que codificam os recetores da serotonina 1B, 1D e 2C, respetivamente. Nesta região localizam-se outros genes como o *GRIA3* - recetor ionotrópico AMPA3 do glutamato; *GABRE* – recetor GABA-A do tipo epsilon; *GABRQ* – recetor teta do GABA e o *GABRA* – recetor 3 do GABA-A. Segundo estes investigadores um *locus* em Xq24-28 poderá estar relacionado com a maior prevalência no sexo feminino. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o papel do cromossoma X na susceptibilidade da enxaqueca.

Recentemente duas abordagens foram adquiridas na investigação genética da enxaqueca baseadas nos sintomas individuais, “trait component analysis” (TCA) e “latent class analysis” (LCA). Esta abordagem teve como objetivo reduzir a heterogeneidade clínica, sendo que os sintomas refletem melhor os mecanismos biológicos influenciados pelas variações genéticas específicas (Anttila *et al.*, 2008). Nyholt *et al.* (2005) foram os primeiros investigadores a usar a LCA para identificar os subgrupos de doentes que sofriam de enxaqueca. Nos seus estudos, a organização dos doentes em subgrupos foi baseada na presença e junção de sintomas individuais de enxaqueca. Nyholt e seus colaboradores (2005) identificaram a região 5q21 que se encontra associada à dor de cabeça. Por sua vez, a TCA foi introduzida por Palotie (Anttila *et al.*, 2006), que comparou a TCA com a LCA, tendo identificado a região 18p11 (Lea *et al.*, 2005).

1.9.1.3 Estudos de associação

Os estudos de associação têm sido muito importantes no estudo de doenças complexas, como a enxaqueca, porque permitem o estudo simultâneo de vários polimorfismos sendo possível investigar a associação entre os polimorfismos e as referidas doenças. As doenças complexas envolvem vários genes e as possíveis interações entre eles e o ambiente. A evidência de associação pode ser devido à distribuição das frequências alélicas ou representar um sinal de ligação a um *locus* candidato na regulação de uma doença (Cordell & Clayton, 2005).

Os estudos de associação comparam as frequências alélicas de marcadores polimórficos existentes em indivíduos não relacionados que tenham uma determinada condição patológica com um grupo de controlos saudáveis, com o objetivo de identificar marcadores associados a uma doença específica. Existem dois principais tipos de estudos de associação: estudos de caso-controlo e os estudos baseados em famílias (Schulze & McMahon, 2003). A principal vantagem de um estudo caso-controlo está na sua simplicidade e a sua principal desvantagem é que, se houver estratificação populacional, ou seja, persistência de heterogeneidade, os resultados dessa associação podem ser falsos. Por sua vez, os estudos em família têm como vantagem a falta de necessidade de emparelhamento entre casos e controlos, evitando assim possíveis problemas associados com estratificação populacional. Contudo, os estudos em família apresentam menor poder estatístico quando comparados com os caso-controlo (Cordell & Clayton, 2005).

A descoberta de um número abundante de SNPs no genoma, bem como a diminuição dos custos da genotipagem têm permitido um maior desenvolvimento dos estudos de associação, de modo a identificar os vários genes de susceptibilidade, cada um com pequeno efeito na etiologia de uma doença complexa, podendo interagir entre si (Cordell & Clayton, 2005; Wilkening *et al.*, 2009).

Com o objetivo de identificar genes de suscetibilidade para as duas formas mais comuns da enxaqueca vários estudos de associação, com genes candidatos envolvidos na patofisiologia da enxaqueca, têm vindo a ser realizados, utilizando uma abordagem caso-controlo ou baseada em famílias, em particular em trios (Vries *et al.*, 2009).

Diversos estudos de associação focaram-se nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, assim como noutros neurotransmissores, devido ao seu envolvimento na patofisiologia desta doença (Maher & Griffiths, 2011). Por exemplo, no estudo de Formicola *et al.* (2010) foi estudada uma população italiana e a possível associação com recetores ionotrópicos do glutamato. Neste estudo foi apresentada a primeira evidência da associação entre variantes genéticas dos recetores do glutamato - GRIA1 e GRIA3 e a MA na população italiana.

No estudo de Jung *et al.* (2010) foi investigado o papel da TPH2 na patogénese da enxaqueca. A TPH (triptofano hidroxilase) é a enzima limitante da biossíntese da serotonina e a sua disponibilidade no cérebro é determinada pela sua taxa de produção. O estudo de Jung *et al.* (2010) sugeriu a possibilidade da influência das variantes genéticas do gene *TPH2*, mapeado no cromossoma 12q21.1 na patogénese da MO. No entanto, estes resultados terão de ser confirmado por outros estudos.

Outros genes candidatos interessantes na investigação da enxaqueca encontram-se no cromossoma 19p13, onde está localizado um dos genes responsáveis pela FHM, o gene *CACNA1A*. Podemos destacar os genes *INSR* – recetor da insulina, *NOTCH3* - recetor Notch3 e o *LDLR* – recetor da lipoproteína de baixa densidade (McCarthy *et al.*, 2001).

O gene do recetor 1 da hipocretina, *HCRTR1*, foi investigado por Rainero *et al.* (2011) com o objetivo de verificar se as variantes genéticas existentes influenciavam a ocorrência e as características clínicas da enxaqueca. Apenas foi encontrado uma associação significativa com a enxaqueca para um dos SNPs estudado após a divisão do grupo de indivíduos com enxaqueca em MO e MA. Rainero e colaboradores obtiveram como conclusão do seu estudo a possibilidade do gene *HCRTR1* representar um fator de susceptibilidade na MO.

Os estudos anteriormente referidos são alguns dos exemplos que demonstram a vasta investigação que tem ocorrido em torno da enxaqueca com o objetivo de compreender melhor a sua causa e origem.

1.9.1.4 Estudos de associação “Genome-Wide”

O primeiro GWAS foi publicado na “Headache Genetics Consortium (IHGC)” em 2010 (Anttila *et al.*, 2010). Este estudo focou-se em cerca de três mil indivíduos com MA, recrutados na Alemanha, Finlândia e Países Baixos e em cerca de 10 mil indivíduos saudáveis das mesmas regiões. Segundo o estudo de Anttila *et al.* (2010) os indivíduos que têm a variante genética específica rs1835740 no cromossoma 8q22.1, localizada entre os dois genes *MTDH* (Metaderina) e *PGCP* (plasma glutamato carboxipeptidase), têm um maior risco de sofrer de enxaqueca (MA e MO). No entanto, é necessário perceber melhor o papel dos polimorfismos nos genes *MTDH* e *PGCP*, porque ambos desempenham um papel na regulação dos níveis de glutamato no cérebro. Para além do rs1835740, 11 novos SNPs foram associados à enxaqueca relacionados com diversos genes, onde podemos destacar os genes *SMYD3*, *INSIG2*, *TRPM8*, *MYLK4*, *ZNF311*, *SGCZ*, *NAV2*, *COG3* e *AQP9*.

O segundo estudo GWAS descobriu mais três *loci* implicados na fisiopatologia da enxaqueca: *PRDM6*, *LPR1* e *TRPM8*. O gene *PRDM16* (“PR domain containing 16”) e *TRPM8* (“Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8”) são específicos da enxaqueca. O *TRPM8* contém um marcador genético para a dor que é principalmente expresso nos neurónios sensoriais (Peier *et al.*, 2002). A enxaqueca e a dor neuropática apresentam características semelhantes pelo que o *TRPM8*, desempenha um

papel importante na enxaqueca (Biondi, 2006). O *LRP1* (“Low density lipoprotein receptor-related protein 1”) pertence à família dos recetores das lipoproteínas e interage com o glutamato. Com a descoberta do envolvimento do glutamato na enxaqueca fica cada vez mais explícito o seu papel na fisiopatologia da enxaqueca (Anttila *et al.*, 2010). Nenhuma das variantes genéticas anteriormente referida parece estar envolvida diretamente com os tipos mais comuns de enxaqueca. A influência destes genes provavelmente não é suficiente para serem imediatamente usados como uma ferramenta de diagnóstico, mas é um avanço na compreensão da enxaqueca. Logo, as associações com os genes *TRPM8*, *LRP1* e *PRDM6* parecem influenciar a enxaqueca e a dor neuropática (Weir & Cader, 2011).

O gene *MTHFR C677T* (5,10 -metilenetetrahidrofolato redutase), que codifica uma enzima relacionada com o metabolismo da homocisteína e do folato, tem sido associado à fisiopatologia da doença. O estudo de Samaan *et al.* (2011) pretendeu investigar o papel desta variante na enxaqueca, a partir de uma revisão sistemática e da meta-análise de estudos existentes que envolvem o *MTHFR*. Com o levantamento da informação proveniente da sua pesquisa foi possível constatar que a maioria dos estudos realizados encontrou uma associação do alelo T com a enxaqueca, resultado do aumento moderado dos níveis de homocisteína que poderá causar a enxaqueca através do seu efeito de disfunção vascular endotelial. No entanto, é necessário ainda demonstrar mais evidências que apoiem tais descobertas.

1.9.1.5 Estudos de associação realizados em Portugal

Em Portugal, um grupo de investigadores do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) no Porto, tem vindo a desenvolver vários estudos na população portuguesa sobre a enxaqueca comum. Lemos *et al.* (2010) realizaram um estudo cujo objetivo consistiu em investigar o papel do *BDNF* na suscetibilidade da enxaqueca e do *CGRP* e a possível interação entre eles. O estudo foi efetuado num grupo de 188 doentes e um grupo controlo de 287 indivíduos. No estudo foi possível verificar que existe uma interação entre o gene *BDNF* e *CGRP* na susceptibilidade da enxaqueca. Recentemente, o mesmo grupo (Lemos *et al.*, 2011) avaliou o papel do recetor A da endotelina (EDNRA) na susceptibilidade da enxaqueca na mesma amostra de indivíduos. As conclusões obtidas no estudo permitiram associar o recetor A da endotelina e a suscetibilidade à enxaqueca.

Num outro estudo, Lemos *et al.* (2010) estudaram variantes genéticas do gene *STX1A* com o objetivo de identificar variantes que conseguissem explicar uma maior susceptibilidade de alguns indivíduos para a enxaqueca. Os resultados obtidos no estudo possibilitaram pela primeira vez associar o gene *STX1A* à susceptibilidade da doença na população portuguesa.

1.10 Sintaxina

A sintaxina 1A é uma proteína transmembranar pré-sináptica, expressa quase que unicamente nos neurónios e nas células secretoras (Corominas *et al.*, 2009). O complexo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) é constituído por um conjunto de proteínas das quais a sintaxina 1A, da família das sintaxinas, faz parte (Lemos *et al.*, 2010). A sintaxina 1A está envolvida no acoplamento e/ou de fusão das vesículas sinápticas, desempenhando um papel fundamental na libertação dos neurotransmissores. A sintaxina 1A também interage diretamente no funcionamento e regulação dos canais iónicos, tais como canais de Ca^{2+} , reguladores da condutância transmembranares dos canais de Cl^- , canais de K^+ , canais epiteliais de Na^+ e nos canais transportadores dependentes de Na^+/Cl^- como o GABA, a norepinefrina e a serotonina transportadora de glicina. A modulação dos canais e transportadores envolvidos ocorre através de uma redistribuição para e a partir da membrana plasmática. Contudo, e embora se verifique que a sintaxina 1A é responsável pela deslocação dos transportadores de neurotransmissores excitatórios, os seus mecanismos ainda não estão totalmente compreendidos (Yu *et al.*, 2006).

O gene *STX1A*, localizado no cromossoma 7q11.23, codifica a proteína sintaxina 1A (OMIM 186590) que interage com o transportador pré-sináptico da serotonina, uma molécula longa envolvida na fisiopatologia da enxaqueca, que leva a alterações na sua localização subcelular e provoca uma redução na recaptção da serotonina (Corominas *et al.*, 2009).

Objetivos do estudo

2. Objetivos do estudo

A enxaqueca é uma patologia complexa que afeta grande parte da população mundial, incluindo a portuguesa. Uma vez que o estudo de Lemos *et al.* (2010), verificou o envolvimento do gene *STX1A* na enxaqueca, na população do continente português, considerou-se pertinente replicá-lo numa outra população portuguesa.

O presente projeto de investigação decorre no âmbito de uma colaboração entre o grupo de Epidemiologia e Genética Humana do CIRN (Universidade dos Açores) e o grupo do IBMC que reportou a associação entre a enxaqueca e o gene *STX1A*. A primeira fase desse estudo de replicação consiste na caracterização dos indivíduos controlo. Assim, o objetivo principal do estudo é a caracterização de uma amostra de 106 indivíduos controlo (sem enxaqueca), não relacionados relativamente aos *tagging* SNPs - rs3793243, rs941298 e rs6951030 do gene *STX1A* e à análise intra e inter-populacional dos resultados obtidos. Em particular, comparar-se-á o perfil alélico da população controlo açoriana com a população controlo do continente português, já previamente estudada por Lemos *et al.* (2010). Pretende-se, futuramente, integrar os dados resultantes da presente tese com os resultados a obter para os casos, de modo a replicar na população açoriana a associação já reportada para o gene *STX1A*. Tal confirmação é importante uma vez que, entre outros aspetos, permitirá reforçar o papel destas variantes na susceptibilidade à enxaqueca e o seu potencial como alvos terapêuticos e, assim, contribuir no futuro, para a diminuição da ocorrência da enxaqueca nos doentes.

Sujeitos e Métodos

3 Sujeitos e Métodos

3.1 Amostragem

O presente estudo foi desenvolvido na população da ilha de São Miguel, Açores. O estudo incluiu 106 participantes voluntários, que aceitaram participar no projeto e que deram o seu consentimento informado, selecionados na cidade de Ponta Delgada. Os participantes do estudo corresponderam a indivíduos sem enxaqueca, que serão usados como controlos num estudo genético subsequente, de modo a estabelecer comparações com indivíduos com enxaqueca. Para a seleção dos participantes a incluir no estudo foi realizado um levantamento de informação de vários artigos científicos sobre a enxaqueca, Boomsma *et al.*, 2006; Hofman *et al.*, 2007; Slegers *et al.*, 2007; Penninx *et al.*, 2008; Stam *et al.*, 2010 e Ligthart *et al.*, 2011, com o objetivo de determinar a proporção de homens e mulheres a utilizar no estudo, bem como os limites de idades dos participantes. Concluiu-se que 80% dos participantes seriam do sexo feminino e 20% do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 25-40 anos.

Todos os participantes do estudo foram selecionados com base num questionário semelhante ao usado na consulta externa de cefaleias do Hospital de Santo António, no Porto (Tabela 1) tendo sido recolhidos os dados relativos ao sexo, idade e naturalidade.

Tabela 1: Questionário com os critérios de inclusão e exclusão no estudo.

Questões	Hipótese de resposta	Inclusão/Exclusão no estudo
Alguma vez sofreu de dores de cabeça?	Sim	Excluir
	Sim, mas muito raramente	Continuar com as perguntas
	Não	Continuar com as perguntas
Essas dores de cabeça raras são esporádicas mas persistentes, aparecendo sempre na mesma altura, impedindo-o de trabalhar ou obrigando-o a tomar medicação? Ou: Nunca teve mesmo dores de cabeça, nem associado a stress ou doença?	Sim	Excluir
	Sim, mas só tipo ½ vezes por ano em alturas de muito stress e ou apenas associadas a gripe, constipação ou algum mal-estar	Incluir
	Não, nunca tive mesmo - Homem	Incluir
	Não, nunca tive mesmo - Mulher	Continuar com as perguntas
Sendo mulher, durante a menstruação, não costuma ter dores de cabeça associada a esta fase do mês?	Sim	Excluir
	Não, nunca mesmo	Incluir

Para os 106 indivíduos a incluir no estudo foram colhidas duas séries de esfregaço da mucosa bucal.

3.2 Genotipagem

3.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA genómico a partir do esfregaço da mucosa bucal foi realizada usando o *JETQUICK Tissue DNA SPIN Kit (GENOMED)*, de acordo com as indicações do fabricante. Posteriormente, fez-se a quantificação do DNA no Nanodrop® 2000 – Thermo SIENTIFIC.

Os participantes foram genotipados para três *tagging* SNPs no gene *STX1A* (OMIM 186590) para o estudo genético: NM_001165903.1:c.208+1572 T>C (rs3793243), NM_004603.3: c.31-1811C>T (rs941298) e o NC_000007.13: g.73133241 G>T (rs6951030). Os *tagging* SNPs utilizados no presente estudo foram os mesmos do estudo de Lemos *et al.* (2010). Para os rs941298 e rs6951030 foram genotipados 103 indivíduos enquanto que para rs3793243 foram genotipados 33 indivíduos.

Os SNPs selecionados foram *tagging* SNPs do projeto HapMap, anteriormente descritos como estando associados à enxaqueca (Barrett *et al.*, 2005). A seleção dos *tagging* SNPs baseia-se na presença de elevados níveis de *linkage disequilibrium* (LD) com outros SNPs, permitindo desta forma eliminar a informação redundante e cobrindo a variação comum de um gene (Goode *et al.*, 2007). O rs6951030 (localizado no cromossoma 7: – 72 771 177, de acordo com a base de dados Ensembl) encontra-se numa região conservada, podendo indicar um importante papel na regulação génica; por sua vez o rs941298 (72 771 177) está circunscrito numa região triplex, podendo provocar alterações na sua formação e estrutura, e causando alterações na regulação; por último o rs3793243 (72 759 283), localizado entre o exão 3 e 4 do gene *STX1A*, também apresenta um papel importante na regulação do gene (Figura 2).

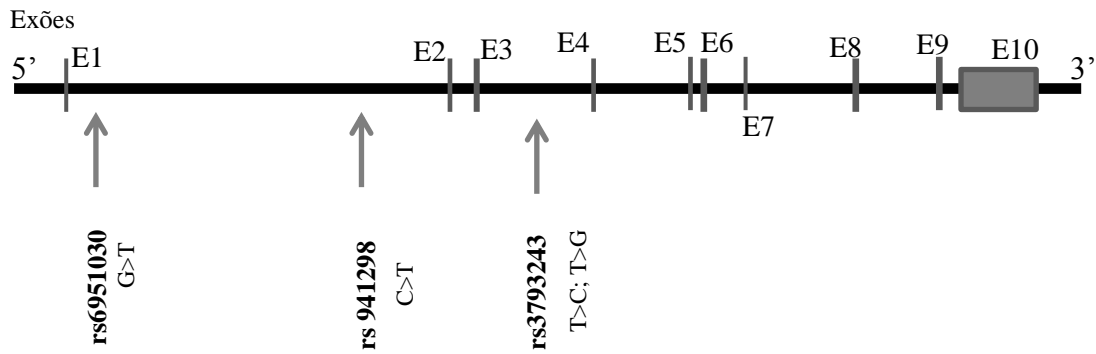


Figura 2: Estrutura do gene *STX1A* com a posição relativa dos SNPs estudados (adaptado de Corominas *et al.*, 2009).

A genotipagem dos SNPs rs941298 e rs6951030 foi efetuada por PCR-RFLP, enquanto que o rs3793243 foi estudado por sequenciação.

3.2.2 PCR – RFLP

O DNA foi amplificado por Polymerase Chain Reaction (PCR), usando os *primers* descritos na tabela 2.

Tabela 2: Sequência de *primers* e tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação

Gene	SNP	Primer “Forward”	Primer “Reverse”	Tamanho do produto de PCR
<i>STX1A</i>	rs941298	5' CCTGTCTCAATCAATCAATCAG3'	3'GGGCCTTAACCCCTCTGG5'	150pb
	rs6951030	5'AAAATAGATCCAAGTCGCAGG3'	3'TGTGGCTCCCATCACCTG5'	184pb

A reação de amplificação para o rs941298 e para o rs6951030 foi efetuada num volume de 25 µl com 10x tampão de reação de PCR [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCL (pH 8,8 a 25°C) 0,1% Tween-20], 1,25 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTPs, 0,3 µM do *primer* Forward e Reverse, 2 U de Biotaq DNA polimerase (Bioline) e 100 ng de DNA

genómico. Para ambos os rs foram utilizadas as seguintes condições de PCR: uma desnaturação inicial de 5' a 94°C; seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C durante 40'', 58°C durante 30'' para o *annealing* e 72°C durante 1' para a polimerização das novas cadeias; e por último uma extensão final de 72°C durante 7'. Em todas as reações de PCR foram utilizados controlos positivos e negativos. Para confirmação da obtenção do produto amplificado, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2%.

Um RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste num tipo de polimorfismo que permite detetar as diferenças genéticas por comparação da variação dos tamanhos dos fragmentos obtidos pelo corte da cadeia de DNA por ação de uma endonuclease de restrição (Botstein *et al.*, 1980).

As condições para a reação de digestão enzimática para os SNPs em estudo constam das tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Preparação da reação de digestão enzimática do rs941298.

Componentes	Volume (µl)
H2O	4,4
1X NEBuffer 4	1
100X BSA	0,1
<i>HpyAV</i>	0,5
DNA	4

Tabela 4: Preparação da reação de digestão enzimática do rs6951030.

Componentes	Volume (µl)
H2O	5,5
1X Buffer Tango	1
<i>BseDI (BsaII)</i>	0,5
DNA	3

Para o rs941298 e rs6951030 as sequências de reconhecimento da enzima *HpyAV* e *BseDI (BsaII)*, respetivamente estão, representada na Tabela 5.

Tabela 5: Sequência de reconhecimento da enzima *HpyAV* e *Bse (BsaII)*.

Enzima de restrição	Sequência de reconhecimento
<i>HpyAV</i>	5'... CCTC (N) ₇ ... 3' 3'... GGAG (N) ₆ ... 5'
<i>BseDI (BsaII)</i>	5'...C [▼] CNNGG ^{...} ₃ ' 3'...G ^{...} GNNC [▲] C ^{...} ₅ '

A temperatura de incubação para a enzima *HpyAV* foi de 37°C e para a enzima *BseDI (BsaII)* foi de 55°C. Ambas as enzimas foram colocadas a incubar *overnight* (16horas).

Os padrões de restrição obtidos para cada polimorfismo são os seguintes:

- rs941298 - a enzima de restrição *HpyAV* reconhece o sítio de corte quando o alelo T está presente, originando um fragmento 90pb e outro de 60pb. Quando o alelo C está presente o fragmento obtido é de 150pb.

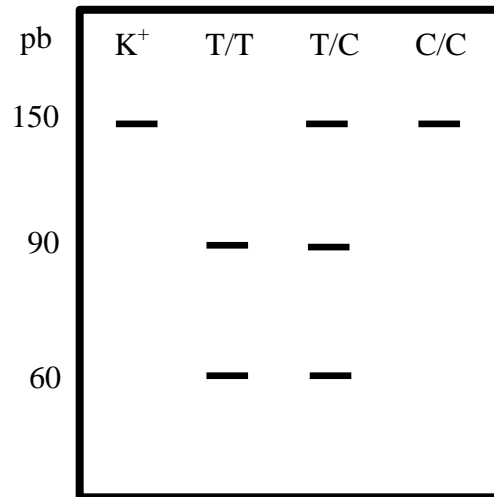


Figura 3: Genótipos possíveis para o polimorfismo rs941298 [C/T].

Legenda: K⁺ - Controlo Positivo.

- rs6951030 - a enzima de restrição *BseDI* (*BsaII*) reconhece o local de corte quando o alelo G está presente, originando quatro fragmentos: 66pb, 49pb, 37pb e 32pb. Por sua vez, quando o alelo T está presente o fragmento apresenta três fragmentos, 86pb, 66pb e 32pb.

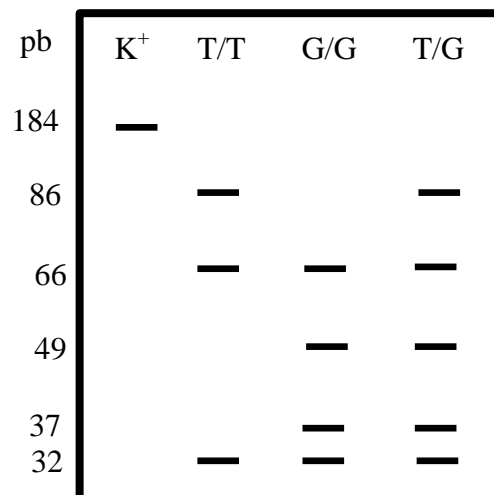


Figura 4: Genótipos possíveis para o polimorfismo rs6951030 [G/T].

Legenda: K⁺ - Controlo Positivo.

3.2.3 Sequenciação

O DNA para o polimorfismo rs3793243 foi amplificado utilizando os seguintes *primers* *STX1A* F (5'ACTGGCTTAGTTGGTGTG 3') e *STX1A* R (3'GTCAGATTTTCTTCTCACCTC 5').

A reação de amplificação para o rs 3793243 foi efetuada num volume de 50 µl com 20x tampão de reação de PCR [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCL (pH 8,8 a 25°C) 0,1% Tween-20], 2,5 mM de MgCl₂, 1,0 mM de dNTPs, 0,6 µM do *primer* Forward e Reverse, 4 U de Biotaq DNA polimerase e 100 ng de DNA genómico. Para o polimorfismo em estudo foram utilizadas as seguintes condições de PCR: uma desnaturação inicial de 5' a 94°C; seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C durante 40'', 64°C durante 30'' para o *annealing* e 72°C durante 1' para a polimerização das novas cadeias; e por último uma extensão final de 72°C durante 7'. Em todas as reações de PCR foram utilizados controlos positivos e negativos. Para confirmação da obtenção do produto amplificado, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2%.

Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o *PureLink® PCR Micro Kit* (*Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de sequenciação dos produtos de PCR anteriormente obtidos foi realizada num volume de 20 µl com 100ng de DNA purificado, 2 µl de 5xtampão, 2 uM do *primer* Reverse, 2 µl de Big Dye ® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e água até perfazer o volume total. Posteriormente, para a reação de sequenciação foram utilizadas as seguintes condições: uma primeira desnaturação durante 1' a 96°C, seguida de 36 ciclos de 10'' a 96°C, 5'' a 50°C e 4' a 60°C mantendo-se depois a reação a 4°C. De seguida as amostras foram purificadas pelo método de Precipitação por EDTA/Etanol. Por último, as amostras foram ressuspendidas em 10 µl de formamida e as leituras foram efetuadas num sequenciador ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram visualizadas e analisadas através do programa Chromas Lite 2.1 (Technelysium) e Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

3.3 Análise estatística

As frequências genóticas e alélicas foram determinadas para os 3 SNPs em estudo. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para os SNPs através de um teste exato, de acordo com Guo e Thompson (1992). O valor da diversidade genética, tal como descrito por Nei (1987), foi calculado para os mesmos SNPs. Todos os testes acima referidos foram efetuados recorrendo ao programa GenePop®3.4 (Raymond & Rousset, 1995). No programa GenePop®3.4 foi também efetuada a análise de *linkage disequilibrium* -LD.

O programa Arlequin®3.0. (Excoffier *et al.*, 2005) foi usado para estimar a diversidade haplotípica, para efetuar testes exatos de diferenciação de populações, usando as frequências alélicas obtidas na base de dados do NCBI (rs6951030-http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?chr=NC_000007.13&from=73132741&to=73133741; rs941298 – http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=941298); rs3793243 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?chr=NC_000007.13&from=73120847&to=73121847&mk=73121347:73121347|rs3793243>s=rs3793243) e para analisar a entidade alélica, utilizando a estatística F.

Para obter uma representação visual das afinidades entre as várias populações comparadas, foi realizada uma análise *Multidimensional Scalling* (MDS) com base nos valores de distâncias genéticas (*F_{ST}*). Para a análise MDS recorreu-se ao programa “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS) versão 15.0. O teste de Mantel também foi realizado com o objetivo de verificar se existia uma correlação entre a distância genética e geográfica para os SNPs em estudo. Para a realização deste teste utilizou-se o programa PASSaGE v2 (Rosenberg & Anderson, 2011).

Para os indivíduos que disponham de genótipos para os 3 SNPs procedeu-se à análise haplotípica. O programa Arlequin®3.0 foi utilizado para determinar a fase gamética mais provável, tendo em conta os genótipos dos 3 SNPs.

Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão

No presente estudo foi analisada uma amostra constituída por 103 indivíduos, sem enxaqueca, relativamente aos *tagging* SNPs - rs941298, rs6951030 e rs3793243 do gene *STX1A*. A idade média dos indivíduos incluídos no estudo foi de 32 anos ($DP \pm 6,32$), sendo que 80% eram do sexo feminino e 20% do sexo masculino.

a) Frequências alélicas e genótípicas dos 3 SNPs na população açoriana

Os valores das frequências alélicas e genótípicas para os SNPs estudados encontram-se descritos na Tabela 6. Para os polimorfismos os rs941298 e rs6951030, foram genotipados 103 indivíduos, ao passo que para o rs3793243 foram genotipados 33 indivíduos. Na população açoriana em estudo, foram observados os 3 genótipos possíveis para cada SNP.

O alelo C é o mais frequente para o rs941298, o alelo T para o rs6951030 e o alelo T para o rs3793243. No rs941298 verifica-se que o genótipo mais frequente é o heterozigótico, com a maioria dos indivíduos apresentando o genótipo CT. Por sua vez, para o rs6951030, a amostra estudada é, na sua maioria, homozigótica TT. Por último, o genótipo heterozigótico TC é o mais frequente no rs3793243.

Tabela 6: Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs em estudo.

SNP	Alelos	Nº, (%)
rs941298 (N=103)	T	67(32,5)
	C	139(67,5)
rs6951030 (N=103)	T	154(74,8)
	G	52(25,2)
rs3793243 (N=33)	T	34(52,94)
	C	32(47,10)
	Genótipos	Nº, (%)
rs941298 (N=103)	TT	8(7,8)
	CT	51(49,5)
	CC	44(42,7)
rs6951030 (N=103)	TT	58(56,3)
	TG	38(36,9)
	GG	7(6,8)
rs3793243 (N=33)	TT	8(24,2)
	TC	18(54,5)
	CC	78(21,2)

Tendo em conta as frequências descritas na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), para o rs941298 e rs3793243, era previsível que o genótipo mais frequente fosse o heterozigótico; para o rs6951030 esperar-se-ia encontrar um maior número de indivíduos em homozigotia para o alelo derivado, não-ancestral (alelo T). Globalmente, as frequências observadas dos genótipos na população açoriana estão de acordo com o esperado segundo a base de dados do NCBI e o projeto de referência do HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os testes exatos realizados para avaliar a conformidade com o equilíbrio de Hardy-Heinberg (HW) originaram valores não significativos ($p > 0,05$) para os 3 SNPs, constando-se, desta forma, que as frequências genótípicas estão de acordo com a situação de equilíbrio (Tabelas 7).

Tabela 7: Genótipos observados e esperados, e análise do equilíbrio de HW.

	Genótipos	Observados	Esperados	p (HW)
rs941298	TT	8	10,78	0,265
	CT	51	45,43	
	CC		46,78	
rs6951030	TT	58	57,46	0,796
	TG	38	39,06	
	GG	7	6,47	
rs3793243	TT	8	8,40	0,7345
	TC	18	17,19	
	CC	7	7,4	

b) Análise da diversidade genética para os 3 SNPs analisados

Os valores da diversidade genética obtidos para os 3SNPs estão descritos na Tabela 8. Estes valores variam entre 0,172 e 0,454, o valor mais elevado de diversidade foi encontrado no rs941298 que produziu valores de heterozigotia na ordem dos 45,4%. Por outro lado, o fato da amostra estudada, correspondente a indivíduos sem enxaqueca para o rs3793243 apresentar um valor de diversidade genética relativamente mais baixo em comparação com os outros 2 SNPs poderá estar relacionado com o número reduzido de indivíduos incluídos na genotipagem preliminar deste SNP.

Tabela 8: Valores de diversidade genética para os 3 SNPs em estudo.

SNPs	Diversidade Genética
rs941298	0,454
rs6951030	0,391
rs3793243	0,172

c) Comparação das frequências alélicas e genótípicas entre as duas populações

A Tabela 9 apresenta as frequências genótípicas e alélicas do presente estudo assim como as do estudo de Lemos *et al.* (2010). Em relação às frequências alélicas verificou-se que tanto em Portugal Continental como em São Miguel o alelo mais frequente para o rs941298 e rs6951030 é o mesmo, alelo C e T, respetivamente. Para o rs3793243 constatou-se que o alelo mais frequente na população açoriana é o T e na população continental o C. Tal fato poderá dever-se ao tamanho reduzido da amostragem (N=33) utilizada, como foi já referido.

Por comparação verifica-se que o genótipo mais frequente para o rs941298 na população do Norte de Portugal Continental é o TT (49,5%), genótipo associado ao aumento de risco da enxaqueca no grupo de doentes analisado no trabalho de Lemos *et al.* (2010); por sua vez na população açoriana é o CT (49,4%). Uma vez que não foram obtidas diferenças significativas nos testes exatos de diferenciação, tal diferença não é significativa. Uma possível justificação para a diferença acima apresentada é o tamanho da amostragem utilizada em São Miguel ser menor (N=103) do que a utilizada em Portugal Continental (N=287). Em relação ao rs6951030 e rs3793243 o genótipo mais frequente nas duas populações é o mesmo, TT e TC, respetivamente.

Tabela 9: Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs em estudo nos indivíduos do presente estudo e do estudo de Lemos *et al.*, 2010.

	Presente estudo					Estudo Lemos <i>et al.</i> , 2010				
	Alélicas, N°, (%)		Genótipo, N°, (%)			Alélicas, N°, (%)		Genótipo, N°, (%)		
	rs941298									
	T	C	TT	CT	CC	T	C	TT	CT	CC
Todos os participantes com enxaqueca						130 (34,6)	246 (65,4)	86 (45,7)	74 (39,4)	28 (14,9)
MO						85 (38,3)	137 (61,7)	20 (18,0)	45 (40,5)	46 (41,4)
MA						45 (29,2)	109 (70,8)	8 (10,4)	29 (37,7)	40 (51,9)
Controlos	67(32,5)	139(67,5)	8(7,8)	51(49,5)	44(42,7)	173 (30,1)	401 (69,9)	142 (49,5)	117 (40,8)	28 (9,8)
	rs6951030									
	T	G	TT	TG	GG	T	G	TT	TG	GG
Todos os participantes com enxaqueca						269 (71,5)	107 (28,5)	95 (50,5)	79 (42,0)	14 (7,5)
MO						160 (72,1)	62 (27,9)	56 (50,5)	48 (43,2)	7 (6,3)
MA						109 (70,8)	45 (29,2)	39 (50,6)	31 (40,3)	7 (9,1)
Controlos	154(74,8)	52(25,2)	58(56,3)	38(36,9)	7(6,8)	455 (79,3)	119 (20,7)	178 (62,0)	99 (34,5)	10 (3,5)

* Continuação da tabela 9

rs3793243

	T	C	TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC
Todos os participantes com enxaqueca						159 (42,3)	217 (57,7)	38 (20,2)	83 (44,2)	67 (35,6)
MO						100 (45,0)	122 (55,0)	26 (23,4)	48 (43,2)	37 (33,3)
MA						59 (38,3)	95 (61,7)	12 (15,6)	35 (45,5)	30 (39,0)
Controlos	34(52,94)	32(47,10)	8(24,2)	18(54,5)	78(21,2)	243 (42,3)	331 (57,7)	45 (15,7)	153 (53,3)	89 (31,0)

No estudo de Corominas *et al.* (2009), para o rs941298, a frequência do genótipo mais frequente bem como dos alelos estão de acordo com o estudo realizado em Portugal Continental. Em São Miguel, os dados referentes às frequências alélicas também são concordantes com os dois estudos aqui referidos. Para o rs6951030, os resultados do estudo feito na Catalunha não foram concordantes com os resultados de Portugal Continental e dos Açores.

d) Comparação com outras populações

Para os polimorfismos rs941298 e rs6951030 a frequência do alelo de risco T (0,325) e G (0,252), respetivamente, em São Miguel é bastante próxima da frequência deste mesmo alelo na população de Portugal Continental. A proximidade existente entre os valores das frequências alélicas para os alelos de risco em São Miguel e Portugal Continental podem indicar sob o ponto vista do gene estudado, uma tendência para o aumento da sua susceptibilidade. Tal fato já seria de esperar, uma vez que o presente estudo pretende replicar a associação para o gene *STX1A* já reportada em Portugal. Em relação ao rs3793243 consta-se que a frequência do alelo T (0,529) apresenta uma ligeira diferença da frequência do alelo T por comparação com a população do Norte de Portugal. Esta diferença deve-se ao reduzido número de amostras utilizadas em estudo. Por sua vez, para o rs941298 a frequência do alelo T apresenta valores mais afastados de populações como o México e Texas. O rs6951030 apresenta valores mais distantes da frequência do alelo G em populações como Yoruba (Itália) e África e por último, o polimorfismo rs3793243 apresenta valores mais díspares da frequência do alelo T para o Japão e México (Tabela 10).

Tabela 10: Comparação das frequências alélicas dos SNPs entre a amostra em estudo e outras populações.

Populações	rs941298		rs6951030		rs3793243	
	Freq. C	Freq. T	Freq. T	Freq. G	Freq. T	Freq. C
Açores- São Miguel	0.675	0.325	0.748	0.252	0,529	0,471
Portugal	0.669	0.3010	0.793	0.207	0,423	0,577
Yoruba	0.912	0.0880	0.6136	0.3864	0.4773	0.5227
Toscana	0.670	0.330	0.7704	0.2296	0.4184	0.5816
Quénia	0.965	0.035	-	-	-	-
México	0.590	0.410	0.9091	0.0909	0.6094	0.3906
Japão	0.785	0.215	0.9494	0.0506	0.6292	0.3708
Espanha	0.736	0.264	0.7857	0.2143	-	-
Texas	0.585	0.415	-	-	-	-
Finlândia	-	-	0.8548	0.1452	0.4624	0.5376
Ásia	0.884	0.116	0.8548	0.1452	-	-
China	0.854	0.146	0.9536	0.0464	0.5550	0.4450
Europa	0.686	0.313	0.8412	0.1588	0.3824	0.6176
África	0.898	0.102	0.6311	0.3689	0.4754	0.5246

As populações usadas nos testes de diferenciação populacional para o SNPs estão indicadas nas tabelas 11, 12 e 13. Para o polimorfismo rs941298, a amostra estudada difere significativamente das amostras de países como África, China, Ásia e Quénia. Como seria de esperar a amostra de indivíduos estudados (sem enxaqueca) não difere da correspondente do N de Portugal Continental. Por sua vez, as populações portuguesas (Açores e Portugal Continental) também não diferem dos países como a Espanha, México, Texas, e Japão.

Para o polimorfismo rs6951030 é possível ver através da tabela 12 que a população dos Açores difere significativamente de populações como a China, Finlândia e Colômbia. Por comparação, a população açoriana não difere significativamente da população portuguesa, como o previsto. Por último, o rs3793243, a amostra açoriana analisada não difere significativamente da amostra de Portugal Continental e ambas também não diferem de populações como África e China.

Uma vez que o presente estudo pretende replicar o estudo de Lemos *et al.* (2010), seria de esperar, tal como aconteceu, que ambas as populações (Açores e Portugal) não apresentassem diferenças entre si.

Tabela 11: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o rs941298, nível significância=0,0500; (+ - p<0,05 ; - p>0,05).

	Açores	Portugal	Yoruba	Toscana	Quénia	México	Luhia	Japão	Espanha	Texas	Ásia	China	Europa	África
Açores		-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Portugal	-		+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
Yoruba	+	+		+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
Toscana	-	-	+		+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Quénia	+	+	+	+		+	-	+	+	+	+	+	+	+
México	-	-	+	-	+		+	+	+	-	+	+	-	+
Luhia	+	+	-	+	-	+		+	+	+	-	-	+	-
Japão	-	+	+	+	+	+	+		-	+	-	-	+	+
Espanha	-	-	+	-	+	+	+	-		+	+	+	-	+
Texas	-	+	+	-	+	-	+	+	+		+	+	+	+
Ásia	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+		-	+	-
China	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-		+	-
Europa	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+		+
África	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	

Tabela 12: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o rs6951030, nível significância=0,0500; (+ - p<0,05 ; - p>0,05).

	Açores	Portugal	Espanha	Yoruba	Toscana	Porto Rico	México	Luhia	Japão	Britânia	Finlândia	Colômbia	China	Europa	África
Açores	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Portugal	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Espanha	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Yoruba	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Toscana	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Porto Rico	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
México	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Luhia	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Japão	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Britânia	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Finlândia	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Colômbia	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
China	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Europa	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
África	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Tabela 13: Significância do teste exato de diferenciação de populações para o r s3793243, nível significância=0,0500; (+ - p<0,05 ; - p>0,05).

	Açores	Portugal	Yoruba	Toscana	Porto Rico	México	Luhia	Japão	Britânia	Finlândia	Colômbia	China	Europa	África
Açores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Portugal	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Yoruba	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Toscana	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Porto Rico	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
México	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Luhia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Japão	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Britânia	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Finlândia	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Colômbia	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Europa	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
África	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

O pool genético português é muito diversificado, uma vez que os portugueses são uma população sul europeia, predominantemente oeste-mediterrânica e atlântico-europeia (Ribeiro & Pereira, 2009). Ao compararmos os Açores e Portugal Continental com as restantes populações já seria de esperar que a população portuguesa apresentasse diferenças significativas em relação a países como a China e o Japão, como se constatou no presente estudo. As diferenças existentes entre estes países ocidentais surgem devido a uma componente geográfica e genética bastante distinta por comparação com a portuguesa. Por sua vez, e como referido anteriormente, os países que apresentaram uma menor diversidade genética são países como Itália e Espanha, pois geneticamente têm uma componente mais semelhante. A título de curiosidade também se verifica que a língua falada nestes países é bastante semelhante entre si.

Diversos estudos portugueses têm vindo a ser desenvolvidos ao longo dos últimos anos. Alguns destes estudos têm demonstrado um interesse permanente na comparação entre populações, nomeadamente Açores e Portugal Continental.

Recentemente, Cymbron *et al.* (2011) realizaram um estudo transversal sobre os fatores de risco para a aterosclerose na população açoriana, pois esta patologia apresenta uma taxa de mortalidade duas vezes mais elevada nas ilhas dos Açores do que em Portugal Continental. O perfil genético analisado nos açorianos foi semelhante ao observado em outras populações europeias, onde destacamos a população de Portugal Continental. Por sua vez, o estudo de Bettencourt *et al.* (2006) teve como objetivo descrever o polimorfismo da APOE no arquipélago dos Açores. As frequências alélicas e genotípicas resultantes deste estudo para a população açoriana apresentaram valores estatísticos muito semelhantes aos obtidos nos estudos de Schiele *et al.* (2000) e Rodrigues *et al.* (2005), realizados na população de Portugal Continental.

Fernando e seus colaboradores (2005) investigaram a história do povoamento dos Açores através de 11 marcadores bialélicos para o cromossoma Y em indivíduos açorianos não aparentados. Os resultados obtidos demonstraram que o perfil genético da população masculina dos Açores revelava elevadas afinidades com o perfil genético de Portugal Continental. Esta semelhança encontra-se de acordo com as fontes históricas que dizem que os portugueses foram os principais responsáveis pela origem da população açoriana. Por outro lado, a investigação de Lima *et al.* (2005) consistiu no estudo dos mecanismos moleculares da mutação responsável pelo surgimento dos alelos expandidos (CAG) na doença de Machado-Joseph, estudando cromossomas normais e testando a associação da distribuição destes alelos com a representação da doença. Lima *et al.* (2005) constataram

que o perfil alélico das amostras (Centro, Sul, Norte de Portugal, Madeira e Açores) se encontrava dentro do intervalo normal para a patologia. A correlação entre a representação epidemiológica da doença de Machado-Joseph em cada distrito e a frequência dos alelos normais não foi significativa. Portanto, a ausência de associação entre o tamanho das repetições e a representação da patologia demonstra que a prevalência não está refletida na frequência dos alelos normais grandes. Ainda em 2005 mais um estudo realizado na população açoriana foi publicado. Montiel e colegas estudaram a composição do cromossoma Y na população dos Açores, através da análise de 20 polimorfismos bialélicos localizados na porção não recombinante do cromossoma Y (NRY). Analogamente ao relatado para outras populações portuguesas, nos Açores os haplogrupos mais frequentes foram os mesmos, R1 (xR1b3f), E (xE3a) e J. Mais uma vez, e como tem acontecido nos estudos anteriormente referidos, a população açoriana também, neste estudo, não apresentou diferenças significativas por comparação com a população de Portugal Continental.

Por último, o estudo de Santos *et al.* (2003) visou a caracterização genética da população açoriana através do mtDNA, nomeadamente a região HVRI, com o intuito de elucidar certos aspetos da colonização das ilhas. As análises realizadas no estudo apoiaram a ideia de que as linhagens de DNA existentes nos 3 grupos do arquipélago dos Açores são provenientes de Portugal Continental.

e) Análise do grau de diferenciação genética entre as populações

No sentido de compreender quais as afinidades genéticas entre a população açoriana e as outras populações atrás referidas, foi avaliado o grau de diferenciação genética entre as populações, através dos valores de distância genética (*FST*). Na tabela 14 encontram-se reunidos os valores de *FST* para os pares de populações envolvidos na análise. Quando a população açoriana é comparada com as restantes, para os 3 polimorfismos em estudo, verifica-se que não apresenta diferenças com a população de Portugal Continental. Também para ambos os rs941298 e rs6951030, os Açores e Portugal não apresentam diferenças com a Espanha e o México. Para países como a África, Ásia e China, no rs941298, averigua-se uma diferenciação genética mais acentuada por comparação com os Açores e Portugal Continental. Para o rs6951030, os países que apresentam uma maior diferença genética com os Açores são a China e o Japão. Para o rs3793243, e através da observação dos valores da tabela 14 é possível constatar que a população açoriana não apresenta diferenças com a população africana e chinesa.

Após a comparação com as diferentes populações verificou-se que o Japão foi a única população que apresentou uma diferenciação elevada, enquanto que as restantes populações apresentaram uma diferenciação moderada.

Tabela 14: Valores de distância genética (*FST*) para os rs941298, rs6951030 e rs3793243, entre a amostra estudada (amostra do presente estudo) e as restantes populações utilizadas nas comparações.

	rs941298	rs6951030	rs3793243
	São Miguel		
Portugal	0	0	0,0110
Espanha	0,0012	0.0325	-
África	0.1411	0.0236	0
Ásia	0,1023	-	-
China	0,0688	0.1205	0
Europa	0	0.0221	0,0340
Japão	0,0212	0.1706	0,0157
México	0.0075	0.0776	0,0058

($p=0,05$)

Para obter uma representação visual das afinidades entre as várias populações comparadas, foi realizada uma análise *Multidimensional Scalling* - MDS com base nos valores das distâncias genéticas apresentados na tabela 14. Como se pode constatar através da figura 5, e como referido anteriormente, para o polimorfismo rs941298 a população de São Miguel está mais próxima da Espanha, México, Europa, Japão e Portugal. Por sua vez, encontra-se mais distante de África e Ásia.

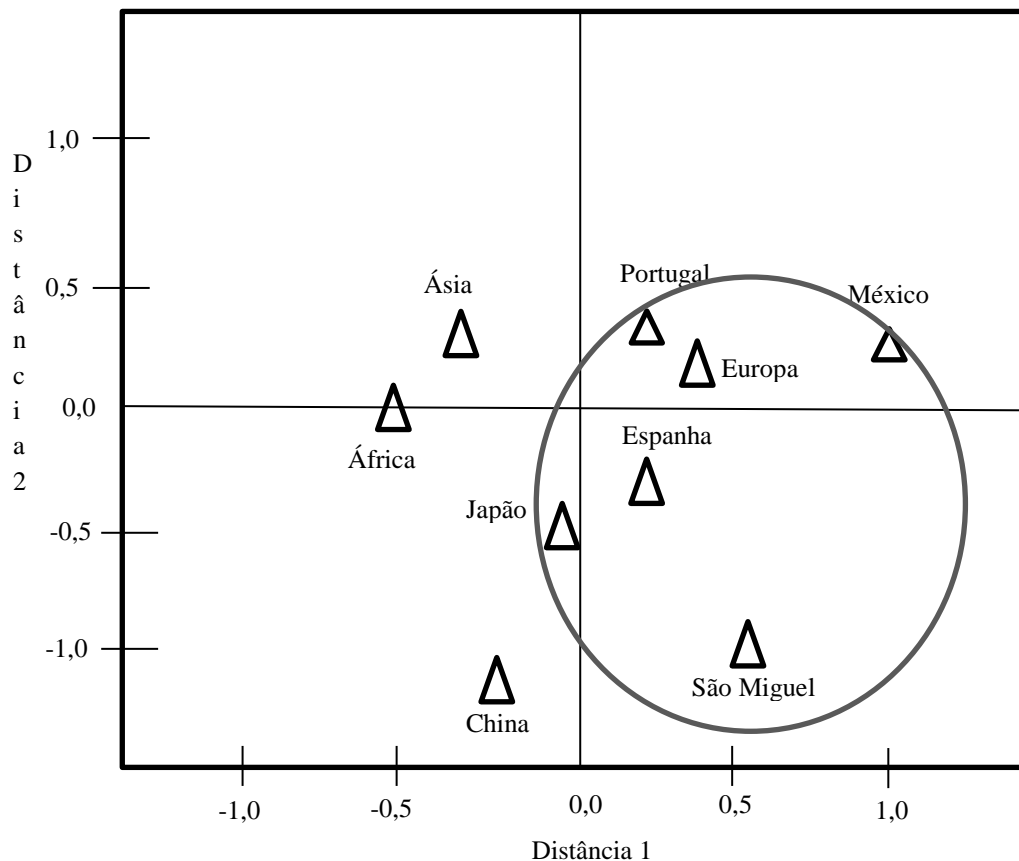


Figura 5: Plot resultante da análise multidimensional baseada nos *FSTs* das diversas populações para o rs941298.

A partir da figura 6, para o polimorfismo rs6951030, é possível ter uma melhor percepção do que foi referido anteriormente. Podemos ver que para o rs6951030, a amostra analisada no presente estudo encontra-se distante da China e Japão, e estando mais próxima de Portugal e Espanha. Por sua vez, através da figura 7, rs3793243, verifica-se que a população açoriana está mais próxima de Portugal, China e África.

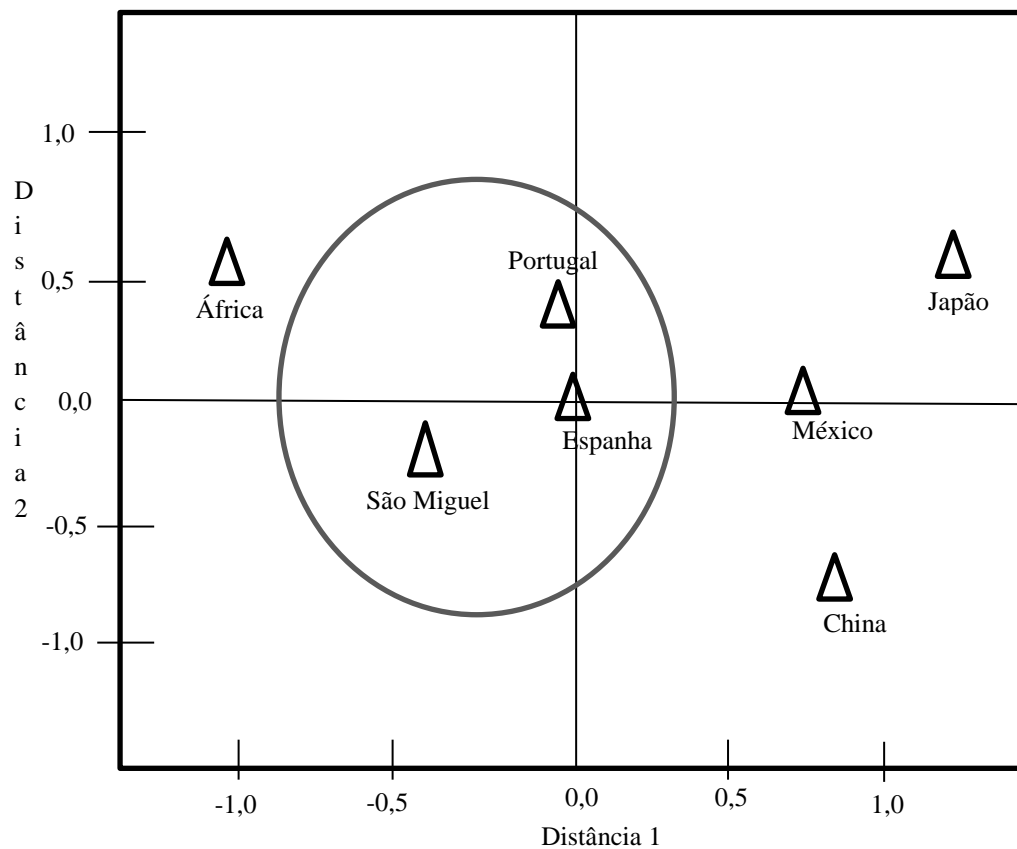


Figura 6: Plot resultante da análise multidimensional baseada nos *FSTs* das diversas populações para o rs6951030.

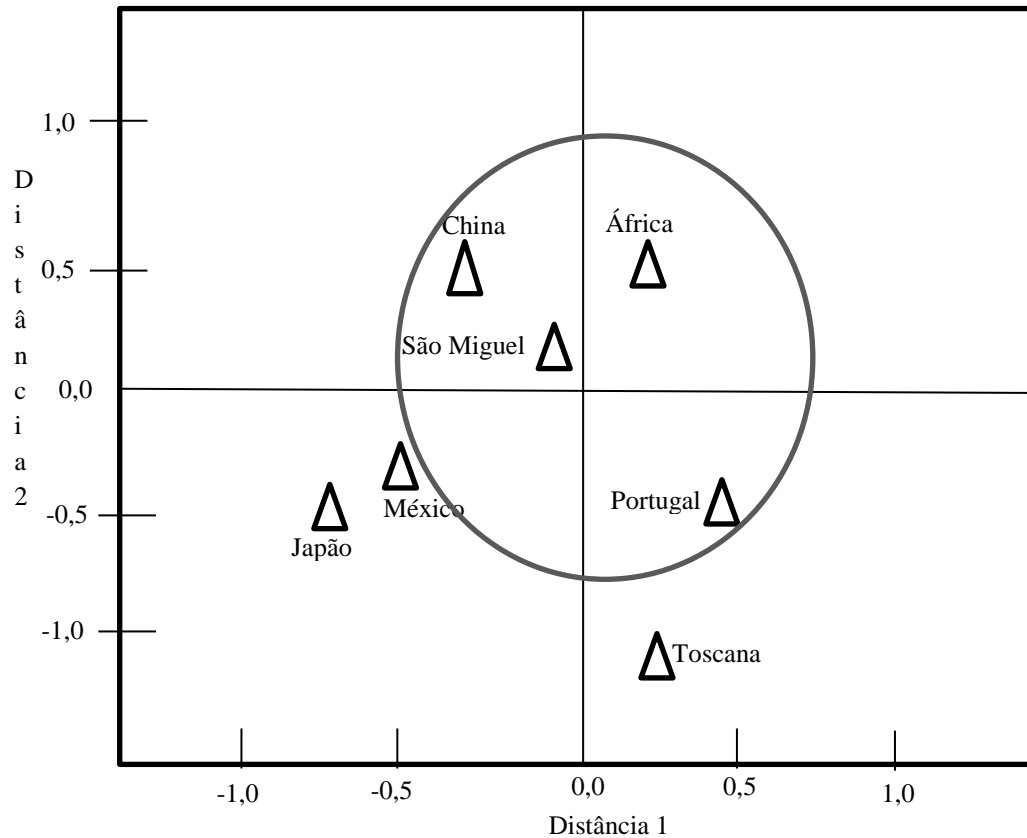


Figura 7: Plot resultante da análise multidimensional baseada nos *FSTs* das diversas populações para o rs3793243.

O teste de Mantel também foi realizado com o objetivo de investigar a significância estatística entre a distância genética e geográfica para os SNPs em estudo. Após a realização do teste, para o rs941298, não foi encontrada nenhuma correlação. Para os rs6951030 e rs3793243 foi encontrada uma baixa correlação entre as matrizes, pois obteve-se um valor de $r^2 < 0,3$. Apenas 32% dos casos para o rs69510, e 17% para o rs3793243 apresentaram uma correlação entre a distância genética e geográfica. No entanto, esta correlação não foi significativa.

f) Análise haplotípica

Na figura 8 estão representadas as frequências dos haplótipos para as duas populações em estudo, São Miguel e Portugal Continental. Ao analisar a população de São Miguel e do Norte de Portugal Continental verificou-se a existência do mesmo número de haplótipos (8). O haplótipo C-T-G foi o menos frequente em ambas as populações, representando 1,5% nos Açores e 1,6% em Portugal Continental. O haplótipo C-C-T foi o mais frequente na ilha de São Miguel, estando presente em 30,9% do total de indivíduos, valor muito próximo ao da população de Portugal Continental (29,2%). Em relação ao haplótipo T-T-T as diferenças foram significativas. Assim, na população do Norte de Portugal este haplótipo apresentou uma maior frequência, (28,7%), enquanto na população açoriana obteve uma frequência de 10,3%. O haplótipo T-C-T também apresentou diferenças significativas entre as populações em estudo. Em São Miguel, o haplótipo T-C-T foi mais frequente, representando 25% do total de haplótipos, por sua vez em Portugal Continental apresentou um valor de 11,6%. As diferenças existentes nestes dois haplótipos podem ser explicadas pelo baixo número de amostras utilizadas em São Miguel (N=33) por comparação com as amostras utilizadas em Portugal (N=287).

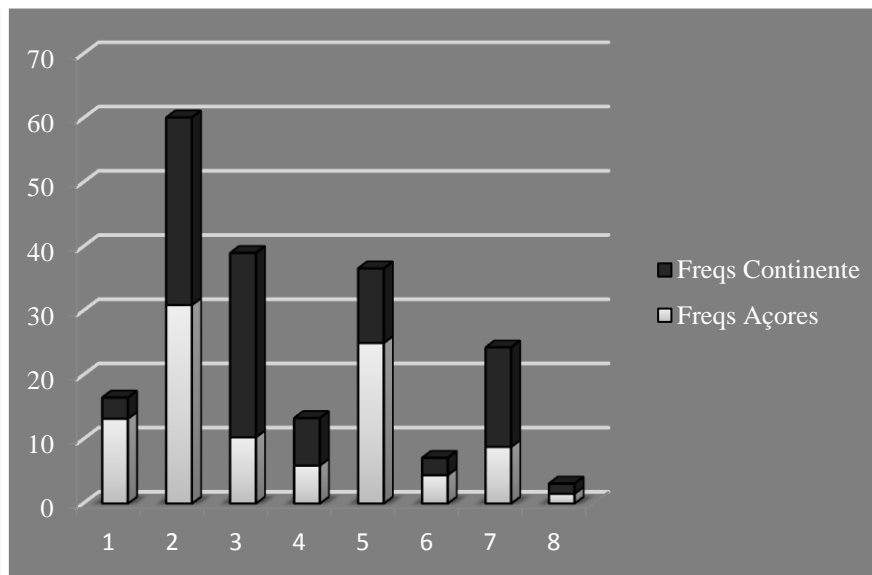


Figura 8: Gráfico das frequências dos haplótipos na população de São Miguel e Portugal Continental.

Legenda: 1- T-T-G; 2- C-C-T; 3- T-T-T; 4- C-T-T; 5- T-C-T; 6- T-C-G; 7- C-C-G; 8- C-T-G.

Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Tal como anteriormente referido, um estudo de Lemos *et al.* (2010) na população portuguesa confirmou o envolvimento da sintaxina 1A (polimorfismo rs941298) na susceptibilidade da enxaqueca. Assim sendo, considerou-se pertinente replicar este estudo numa outra população portuguesa neste caso na população dos Açores, de modo a aprofundar o estudo do envolvimento do gene *STX1A* na susceptibilidade à enxaqueca.

A seleção dos indivíduos sem enxaqueca na ilha de São Miguel foi feita com o objetivo de conseguir uma amostra comparável com os casos, isto é, que pertença à mesma população de base. No presente trabalho os indivíduos sem enxaqueca selecionados foram recrutados a partir de populações que compartilhavam semelhanças geográficas com os indivíduos afetados. A escolha dos indivíduos sem enxaqueca nos Açores, bem como a sua caracterização, foi executada de modo muito semelhante à realizada em Portugal Continental, pois pretendia-se obter uma amostragem o mais homogénea possível entre as duas populações. Nos Açores para a amostra de indivíduos sem enxaqueca foi efetuado um levantamento bibliográfico tendo por base diversas variáveis como a idade e sexo de forma a minimizar as diferenças entre os dois grupos. A escolha minuciosa dos participantes permitiu obter os resultados pretendidos entre as duas populações.

Os resultados referentes ao perfil alélico e genotípico dos indivíduos sem enxaqueca, de São Miguel e Portugal Continental foram comparados e constatou-se que os alelos mais frequentes, para os SNPs rs941298 e rs6951030 foram os mesmos nas duas populações. Porém, para o rs3793243 verificou-se que o alelo mais frequente na população açoriana foi o T e na população continental o C. A diferença alélica aqui apresentada provavelmente dever-se-á ao baixo número de amostras utilizadas neste SNP. Determinou-se, também, que não existiam diferenças significativas relativamente às frequências genotípicas nos Açores e Portugal Continental.

Na população açoriana e do continente português obtiveram-se os 8 haplótipos possíveis. O haplótipo C-T-G foi o menos frequente em ambas as populações. Por sua vez, o haplótipo C-C-T foi o mais frequente nos Açores e o T-T-T o mais frequente em Portugal Continental. Esta diferença dos haplótipos nas duas populações pode ter surgido pelo baixo número de amostras utilizadas em São Miguel.

Em Portugal, nomeadamente nos Açores vários estudos têm sido desenvolvidos desempenhando um importante papel no conhecimento do pool genético destas populações. Muitos destes estudos têm permitido verificar que a população dos Açores é geneticamente

semelhante à de Portugal Continental (Cymbron *et al.*, 2011; Bettencourt *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2005, entre outros).

Outros estudos, em populações não portuguesas também têm sido realizados e têm comprovado o envolvimento de outros genes na suscetibilidade da enxaqueca. No estudo de Schürks e seus colaboradores (2011), foi demonstrado a existência de dois genes diretamente ligados à enxaqueca, o *PRDM16* e o *TRPM8*. Também um terceiro gene foi identificado como o responsável pelo surgimento de dores de cabeça: o *LRP1*.

Com o objetivo de verificar a associação anteriormente referida este estudo foi também replicado em outras populações, nomeadamente na Holanda e Alemanha, o que demonstra que a replicação é fundamental nos estudos de associação de modo a comprovar a existência de uma verdadeira associação com um gene de susceptibilidade e excluir a possibilidade de falsos positivos. Cada vez mais, os estudos estão a ser replicados em populações diferentes. Recentemente, um estudo de Anttila *et al.* (2008), que identifica o *locus* 10q22-23 foi replicado na população da Austrália e Finlândia. Neste mesmo estudo outros *loci* também foram replicados, onde podemos destacar o 8q21, 14q21, 18q12 e Xp21.

Assim, este estudo representa um passo importante na futura replicação dos resultados encontrados por Lemos *et al.* (2010), pois garantimos a seleção de uma amostra de controlos homogénea e que não apresenta diferenças significativas relativamente à população controlo de Portugal Continental.

Futuramente, dever-se-ia aumentar o número de indivíduos sem enxaqueca estudados, bem como incorporar o grupo de casos - indivíduos com enxaqueca, da ilha de São Miguel, de forma a integrar os dados resultantes da presente tese com os resultados a obter para os casos, de modo a replicar na população açoriana a associação já reportada para o gene *STX1A*. A colaboração já estabelecida com o serviço de Neurologia do Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada será crucial no cumprimento deste objetivo.

A confirmação desta associação seria uma mais valia pois permitiria evidenciar o papel destas variantes na suscetibilidade da enxaqueca e o seu potencial e, naturalmente, no futuro, permitir avanços terapêuticos de modo a diminuir a ocorrência da enxaqueca nos doentes.

Bibliografia

6. Bibliografia

- Anttila V, Kallela M, Oswell G, Kaunisto MA, Nyholt DR, Hamalainen E, *et al.* (2006). Trait components provide tools to dissect the genetic susceptibility of migraine. *Am J Hum Genet*, 79(1):85–99.
- Anttila V, Nyholt DR, Kallela M, Artto V, Vepsäläinen S, Jakkula E, *et al.* (2008). Consistently replicating locus linked to migraine on 10q22-q23. *Am J Hum Genet*, 82(5):1–13.
- Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, *et al.* (2010). Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*, 42(10):869–873.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ, (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2):263-265.
- Bettencourt C, Montiel R, Santos C, Pavão ML, Crespo AMV, Lopes PA, *et al.* (2006). Polymorphism of the APOE locus in the Azores Islands (Portugal). *Hum Biol*, 78(4):509-512.
- Biondi DM, (2006). Is migraine a neuropathic pain syndrome? *Curr Pain Headache Rep*, 10(3):167–178.
- Blandini F, Rinaldi L, Tassorelli C, Sances G, Motta M, Samuele A, *et al.* (2006). Peripheral levels of BDNF and NGF in primary headaches. *Cephalalgia*, 26(2): 136–142.
- Blau, JN, (1987). Migraine postdromes: symptoms after attacks. *Cephalalgia*, 11(5):229-231.
- Boomsma DI, de Geus EJC, Vink JM, Stubbe JH, Distel MA, Hottenga JJ, *et al.* (2006). Netherlands Twin Register: from twins to twin families. *Twin Res Hum Genet*, 9: 849–857.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RV, (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.
- Brandes JL, (2009). Migraine and functional impairment. *CNS Drugs*, 23(12):1039-1045.
- Breslau N, Schultz LR, Stewart WF, Lipton RB, Lucia VC, Welch KM, (2000). Headache and major depression: is the association specific to migraine? *Neurology*, 54(2):308-313.

- Buldyrev I, Tanner NM, Hsieh HY, Dodd EG, Nguyen LT, Balkowiec A, (2006). Calcitonin gene-related peptide enhances release of native brain-derived neurotrophic factor from trigeminal ganglion neurons. *J Neurochem*, 99:1338–1350.
- Buzzi MG & Moskowitz MA, (2005). The pathophysiology of migraine: year 2005. *J Headache Pain*, 6:105-111.
- Cady RK, Lipton RB, Hall C, Stewart WF, O'Quinn S, Gutterman D, (2000). Treatment of mild headache in disabled migraine sufferers: Results of the spectrum study. *Headache*, 40:792-797.
- Cardon LR & Palmer LJ, (2003). Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*, 361(9357):598-604.
- Cordell HJ & Clayton DG, (2005). Genetic association studies. *Lancet*, 366(9491):1121-1131.
- Corominas R, Ribasésa M, Cuenca-Leóna E, Narberhaus B, Serrad SA, Toroa M, *et al.* (2009). Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: A case-control association study in the Spanish population. *Neuroscience Letters*, 455(2):105–109.
- Cymbron T, Raposo M, Kazachkova N, Bettencourt C, Silva F, Santos C, *et al.* (2011). Cross-sectional study of risk factors for atherosclerosis in the Azorean population. *Annals of Human Biology*, 38(3):354-359.
- De Fusco M, Marconi R, Silverstri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, *et al.* (2003). Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*, 33:192–196.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, *et al.* (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *The Lancet*, 336:371–377.
- Doods H, Hallermayer G, Wu D, Entzeroth M, Rudolf K, Engel W, *et al.* (2000). Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. *Br J Pharmacol*, 129(3):420–423.
- Duffau H, (2006). Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. *J Clin Neurosci*, 13(9):885-897.
- Durham PL, (2006). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and migraine. *Headache*, 46 (Suppl 1): S3–S8.
- Eikermann-Haerter K & Ayata C, (2010). Cortical spreading depression and migraine. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10:167-173.

- Excoffier L, Laval G, Shneider S, (2005). Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, 1: 47–50.
- Fan HP, Fan FJ, Bao L, Pei G, (2006). SNAP-25/Syntaxin 1A Complex Functionally Modulates Neurotransmitter γ -Aminobutyric Acid Reuptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(38):28174–28184.
- Fejes A, Párdutz A, Toldi J, Vécsei L, (2011). Kynurenine Metabolites and Migraine: Experimental Studies and Therapeutic Perspectives. *Current Neuropharmacology*, 9(2):376-387.
- Fernandez F, Esposito T, Lea RA, Colson NJ, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, *et al.* (2008). Investigation of Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptors genes and migraine susceptibility. *BMC Medical Genetics*. 9(109):1-10.
- Fernando O, Mota P, Lima M, Silva C, Montiel R, Amorim A, *et al.* (2005). Peopling of the Azores Islands (Portugal): Data from the Y Chromosome. *Human Biology*, 77(2):189:199.
- Ferrari MD & Saxena PR, (1993). On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia*, 13:151-165.
- Formicola D, Aloia A, Sampaolo S, Farina O, Diodato D, Griffiths LR, *et al.* (2010). Common variants in the regulative regions of GRIA1 and GRIA3 receptor genes are associated with migraine susceptibility. *BMC Med Genet*, 11:103.
- Fukui P, Gonçalves T, Strabelli C, Lucchino N, Matos F, Santos J, *et al.* (2008). Trigger factors in Migraine Patients. *Arq Neuropsiquiatr*, 66(3-A):494-499.
- Goadsby PJ, Charbit A, Andreou A, Akerman S, Holland P, (2009). Neurobiology of Migraine. *Neuroscience*, 161(2):327–341.
- Goadsby PJ, (2000). The pharmacology of headache. *Progress in Neurobiology*, 62: 509-525.
- Goadsby PJ, (2007). Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med*, 13: 39-44.
- Goode EL, Fridley BL, Sun Z, Atkinson EJ, Nord AS, McDonnell SK, *et al.* (2007). Comparison of tagging single-nucleotide polymorphism methods in association analyses. *BMC Proc*, 1 Suppl 1:S6.
- Guo S & Thompson S, (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48(2): 361-372.
- Hannon J & Hoyer D, (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195(1):198-213.

- Hargreaves RJ & Shepherd SL, (1999). Pathophysiology of migraine—new insights. *Can J Neurol Sci*, 26 Suppl 3:S12-S19.
- Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, (2004). The International Classification of Headache Disorders. *Cephalalgia*, SUPPLEMENT 1, Vol. 24, no. 2:1–160.
- Hofman A, Breteler MMB, van Duijn CM, Krestin GP, Pols HA, Stricker DHC, *et al.* (2007). The Rotterdam Study: objectives and design update. *Eur J Epidemiol*, 22(11): 819–829.
- Jung A, Huge A, Kuhlenbaumer G, Kempt S, Seehafer T, Evers S, *et al.* (2010). Genetic TPH2 variants and the susceptibility for migraine: association of a TPH2 haplotype with migraine without aura. *J Neural Transm*, 117(11):1253–1260.
- Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM, (2002). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research*, 109(2):143-148.
- Kowacs F, Socal MP, Ziomkowski SC, Borges-Neto VF, Toniolo DP, Francesconi CR, *et al.* (2003). Symptoms of depression and anxiety, and screening for mental disorders in migrainous patients. *Cephalalgia*, 23(2):79-89.
- Lam DD & Heisler LK, (2007). Serotonin and EnergyBalance: Molecular Mechanisms and Implications for Type 2 Diabetes. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(5):1-24.
- Lampl C, Voelker M, Diener HC, (2007). Efficacy and safety of 1,000 mg effervescent aspirin: individual patient data meta-analysis of three trials in migraine headache and migraine accompanying symptoms. *J Neurol*, 254:705-712.
- Lea RA, Nyholt DR, Curtain RP, Ovcaric M, Sciascia R, Bellis C, *et al.* (2005). A genome-wide scan provides evidence for loci influencing a severe heritable form of common migraine. *Neurogenetics*, 6(2):67–72.
- Leao AA, (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 7:359–390.
- Lemos C, Castro MJ, Barros J, Sequeiros J, Monteiro JP, Mendonça D, *et al.* (2009). Familial Clustering of Migraine: Further Evidence From a Portuguese Study. *Headache*, 49(3):404-411.
- Lemos C, Mendonça D, Barros J, Sequeiros J, Alonso I, *et al.* (2010). BDNF and CGRP interaction: Implications in migraine susceptibility. *Cephalalgia International Journal Headache*, 30(11):1375–1382.

- Lemos C, Monteiro JP, Mendonça D, Ramos EM, Barros J, Sequeiros J, *et al.* (2010). Evidence of Syntaxin 1A Involvement in Migraine Susceptibility. *Arch Neurol*, 67(4):422-427.
- Lemos C, Neto JL, Monteiro JP, Mendonça D, Barros J, Sequeiros J, *et al.* (2011). A role for endothelin receptor type A in migraine without aura susceptibility? A study in Portuguese patients. *European Journal of Neurology*, 18(4):649–655.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M, (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 69:341-374.
- Levy D, Burstein R, Strassman AM, (2005). Calcitonin gene related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann Neurol*, 58(5):698–705.
- Ligthart L, Vries B, Smith A, Ikram MA, Amin N, Hottenga J, *et al.* (2011). Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *European Journal of Human Genetics*, 19:901–907.
- Lima M, Costa MC, Montiel R, Ferro A, Santos C, Silva C, *et al.* (2005). Population Genetics of Wild-Type CAG Repeats in the Machado-Joseph Disease Gene in Portugal. *Hum Hered*, 60(3):156-163.
- Limnroth V, Cutrer FM, Moskowitz MA, (1996). Neurotransmitters and neuropeptides in headache. *Curr Opin Neurol*, 9:206-210.
- Lipton RB, Bigal ME, Steiner TJ, Silberstein SD, Olesen J, (2004). Classification of primary headaches. *Neurology*, 63(3):427-435.
- Machado J, Barros J, Palmeira M, (2006). Enxaqueca: fisiopatogenia, clínica e tratamento. *Rev Port Clin Geral*, 22:461-470.
- Maher BH & Griffiths LR, (2011). Identification of molecular genetic factors that influence migraine. *Mol Genet Genomics*, 285(6):433–446.
- McCarthy LC, Hosford DA, Riley JH, Bird MI, White NJ, Hewett DR, *et al.* (2001). Singlenucleotide polymorphism alleles in the insulin receptor gene are associated with typical migraine. *Genomics*, 78(3):135–149.
- Menon S, Buteri J, Roy B, Murrell M, Quinlan S, MacMillan JC, *et al.* (2011). Association study of calcitonin gene-related polypeptide-alpha (CALCA) gene polymorphism with migraine. *Brain Research*, 1378:119- 124.
- Monteiro JM, Matos E, Calheiros JM, (1993). Headaches in medical school students. *Neuroepidemiology*, 13:103-107.
- Monteiro JMP, (1995). Cefaleias: estudo epidemiológico e clínico de uma população urbana. Tese de Doutoramento. ICBAS. Universidade do Porto.

- Montiel R, Bettencourt C, Silva C, Santos C, Prata MJ, Lima M, (2005). Analysis of Y-chromosome variability and its comparison with mtDNA variability reveals different demographic histories between Islands in the Azores Archipelago (Portugal). *Ann Hum Genet*, 69(Pt 2):135-144.
- Naito Y, Ishii M, Nagamine A, Imagawa A, Shida K, Takahashi J, *et al.* (2010). Association of the A-1438G Polymorphism in Serotonin 2A Receptor in Migraine with Aura among Japanese Patients. *Biol. Pharm. Bull*, 33(10):1751-1753.
- Nei M, (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nyholt DR, Curtain RP, Griffiths LR, (2000). Familial typical migraine: significant linkage and localization of a gene to Xq24–28. *Hum Genet*, 107(1):18–23.
- Nyholt DR, Lea RA, Goadsby PJ, Brimage PJ, Griffiths LR, (1998). Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Neurology*, 50(5):1428–1432.
- Nyholt DR, Morley KI, Ferreira MA, Medland SE, Boomsma DI, Heath AC, *et al.* (2005). Genomewide significant linkage to migrainous headache on chromosome 5q21. *Am J Hum Genet*, 77(3):500–512.
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, *et al.* (2004). Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *New England Journal of Medicine*, 350:1104- 1110.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, Van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SMG, *et al.* (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*, 87:543–552.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, *et al.* (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5):705–715.
- Penninx BW, Beekman AT, Smit JH, Zitman FG, Nolen WA, Spinhoven P, *et al.* (2008). The Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA): rationale, objectives and methods. *Int J Methods Psychiatr Res*, 17(3):121-140.
- Pereira J, Lima A, Caldas A, Oliveira C, Pontes C, Ferro J, *et al.* (2005). *Sinapse Publicação da Sociedade Portuguesa de Neurologia*, SUPLEMENTO 1, Vol. 5, no. 1.
- Pietrobon D & Striessnig J, (2003). Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*, 4:386-398.
- Pietrobon D, (2005). Migraine: new molecular mechanisms. *Neuroscientist*, 11(4):373-386.
- Pietrobon D, (2007). Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics*, 4(2):274-284.

- Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J, Ashina M, (2008). Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine. *Cephalalgia*, 28(3):226-236.
- Rainero I, Rubino E, Gallone S, Fenoglio P, Picci LR, Giobbe L, *et al.* (2011). Evidence for an association between migraine and the hypocretin receptor 1 gene. *J Headache Pain*, 12:193–199.
- Raymond M & Rousset F, (1995). Genepop: population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86:248-249.
- Ribeiro FM & Pereira L. *O Património Genético Português*. Gradiva Publicações. Ciência Aberta, 2009.
- Rodrigues MO, Fonseca A, Dias CM, Albergaria I, Martins G, *et al.* (2005). APOE genotypes and dyslipidemias in a sample of the Portuguese population. *Clin Chem Lab Med*, 43(9):907-712.
- Romeiro LAS, Fraga CAM, Barreiro EJ, (2003). New therapeutical approaches for the treatment of depression: A medicinal chemistry view. *Química Nova*, 26(3):347-358.
- Rosenberg MS & Anderson CD, (2011). PASSAGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3):229-232.
- Russell MB & Olesen J, (1995). Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *Br Med J*, 311(7004):541– 544.
- Russo L, Mariotti P, Sangiorgi E, Giordano T, Ricci I, Lupi F, *et al.* (2005). A new susceptibility locus for migraine with aura in the 15q11–q13 genomic region containing three GABA-A receptor genes. *Am J Hum Genet*, 76(2):327–333.
- Salomone S, Caraci F, Capasso A, (2009). Migraine: An Overview. *The Open Neurology Journal*, 3:64-71.
- Samaan Z, Gaysina D, Cohen-Woods S, Craddock N, Jones L, Korszun A, *et al.* (2011). Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variant (MTHFR C677T) and Migraine: A Case Control Study and Meta-analysis. *BMC Neurology*, 11:66.
- Sanchez-Del-Rio M, Reuter U, Moskowitz MA, (2006). New insights into migraine pathophysiology. *Curr Opin Neurol*, 19(3):294-298.
- Santos C, Lima M, Montiel R, Angles N, Pires L, Abade A, *et al.* (2003). Genetic Structure and Origin of Peopling in The Azores Islands (Portugal): The View from mtDNA. *Annals of Human Genetics*, 67: 433-456.
- Scher AI, Stewart WF, Liberman J, Lipton RB, (1998). Prevalence of frequent headache in a population sample. *Headache*, 38(7):497-506.

- Schiele F, De Bacquer D, Vincent-Viry M, Beisiegel U, Ehnholm C, Evans A, *et al.* (2000). Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis*, 152(2):475-488.
- Schulze TG & McMahon FJ, (2003). Genetic linkage and association studies in bipolar affective disorder: a time for optimism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 123C(1):36-47.
- Schürks M, (2012). Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *Journal Headache Pain*, 13:1–9.
- Schürks M, Chasman DI, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, *et al.* (2011). Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*, 43(7):695-698.
- Shankland WE, (2000). The trigeminal nerve. Part I: An over-view. *Cranio*, 18:238–248.
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, *et al.* (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1):70-75.
- Sicuteri F, (1961). Introduction of serotonin antagonists in therapy. *Clin Ter*, 21:394-423.
- Slegers K, de Koning I, Aulchenko YS, van Rijn MJ, Houben MP, Croes EA, *et al.* (2007). Cerebrovascular risk factors do not contribute to genetic variance of cognitive function: the ERF study. *Neurobiol Aging*, 28(5):735-741.
- SPSS – Statistical Package for the Social Sciences, Version 15.0, developed by SPSS INC, 1989-2006.
- Stam AH, de Vries B, Janssens AC, Vanmolkot KR, Aulchenko YS, Henneman P, *et al.* (2010). Shared genetic factors in migraine and depression: evidence from a genetic isolate. *Neurology*, 74(4):288-294.
- Stovner L, Zwart J, Hagen K, Terwindt G, Pascual J, (2006). Epidemiology of headache in Europe. *European Journal of Neurology*, 13, 333–345.
- Striessnig J, (2005). Pathophysiology of migraine headache: insight from pharmacology and genetics. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2(4):453–462.
- Tajti J, Pardutz A, Vamos E, Tuka B, Kuris A, Bohar Z, *et al.* (2011). Migraine is a neuronal disease. *J Neural Transm*, 118(4):511–524.
- Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S, (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*, 25(2):77-107.

- Thompson SW, Bennett DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahon SB, (1999). Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7714–7718.
- Tikka-Kleemola P, Artto V, Vepsäläinen S, Sobel EM, Raty S, Kaunisto MA, *et al.* (2010). A visualmigraine aura locus maps to 9q21–q22. *Neurology*, 74(15):1171–1177.
- Trauninger A, Leél-Össy E, Kamson D, Póto L, Aradi M, Kövér F, *et al.* (2011). Risk factors of migraine-related brain white matter hyperintensities: an investigation of 186 patients. *Journal Headache Pain*, 12(1):97–103.
- Tropeano M, Wöber-Bingöl C, Karwautz A, Wagner G, Vassos E, Campos-de-Sousa S, *et al.* (2012). Association analysis of STX1A gene variants in common forms of migraine. *Cephalalgia*, 32(3): 203-212.
- Urbach A, Bruehl C, Witte OW, (2006). Microarray-based longterm detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci*, 24:841–856.
- Vries B, Frants R, Ferrari M, Maagdenberg A, (2009). Molecular genetics of migraine. *Hum Genet*, 126(1):115–132.
- Weir GA & Cader MZ, (2011). New directions in migraine. *BMC Medicine*, 9:116.
- Wilkening S, Chen B, Bermejo JL, Canzian F, (2009). Is there still a need for candidate gene approaches in the era of genome-wide association studies? *Genomics*, 93(5):415-419.
- Yu YX, Shen L, Xia P, Tang YW, Bao L, Pei G, (2006). Syntaxin 1A promotes the endocytic sorting of EAAC1 leading to inhibition of glutamate transport. *J Cell Sci*, 119(18):3776-3787.