



**THIAGO DE OLIVEIRA SANTOS MANSUR**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA SINTASE INDUZIDA  
DO ÓXIDO NÍTRICO (iNOS) COM MIGRÂNEA**

***“INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE HAPLOTYPE  
ASSOCIATED WITH MIGRAINE AND AURA”***

**CAMPINAS**

**2012**



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

---

**THIAGO DE OLIVEIRA SANTOS MANSUR**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS  
GENÉTICOS DA SINTASE INDUZIDA DO ÓXIDO NÍTRICO  
(iNOS) COM MIGRÂNEA**

Orientador: **PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS**

***“INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE HAPLOTYPE ASSOCIATED  
WITH MIGRAINE AND AURA”***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp para obtenção do título de mestre em Farmacologia

*“Master’s Dissertation presented to the Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the MSc Grade in Pharmacology”*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Thiago de Oliveira Santos e orientada pelo Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos.

---

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

M318e Mansur, Thiago de Oliveira Santos, 1981-  
Estudo da associação de polimorfismos genéticos da  
sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) com migrânea /  
Thiago de Oliviera Santos Mansur. -- Campinas, SP :  
[s.n.], 2012.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cefaléia. 2. Óxido nítrico. 3. Polimorfismo de  
nucleotídeo único. I. Santos, José Eduardo Tanus dos  
Santos. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with migraine and aura

**Palavras-chave em inglês:**

Headache

Nitric oxide

Polymorphism, single nucleotide

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

José Eduardo Tanus dos Santos [Orientador]

Wilson Araújo da Silva Júnior

Carlos Eduardo Steiner

**Data da defesa:** 02/08/2012

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

# Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

THIAGO DE OLIVEIRA SANTOS MANSUR

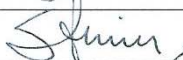
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

## Membros:

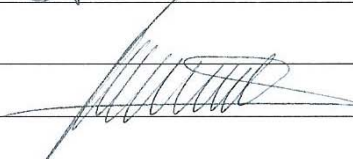
Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos



Professor Doutor Carlos Eduardo Steiner



Professor Doutor Wilson Araújo da Silva Júnior



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/08/2012

Aos meus queridos pais  
William e Lígia  
pelo amor e apoio incondicional  
em todos os momentos de minha vida  
e pelos exemplos de conduta moral e ética.

Ao meu avô Clóvis (*in memoriam*)  
pelo exemplo de honra, ética e perseverança  
na vida pessoal e acadêmica.

À querida Patrícia,  
por sempre acreditar em meu potencial.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por me dar saúde e força para enfrentar os desafios e por me proteger sempre.

Aos meus pais, William e Lígia, pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos, pela confiança em mim depositada e pelo exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao Professor Doutor Edson Antunes, pelas orientações sempre muito oportunas.

À Professora Doutora Fabíola Zakia Taufic Mônica, pelas observações relevantes.

À Doutoranda Flávia Magazzoni Gonçalves, em especial, por toda sua enorme contribuição desde o início do projeto e pela sua disponibilidade de sempre ajudar.

Ao Riccardo Lacchini, pelas explicações detalhadas sobre as técnicas aplicadas mesmo em meio a seus afazeres no Laboratório.

Ao Doutorando Alisson, pelas dicas iniciais do projeto.

Ao Doutorando e amigo Jonas Cau, pelo incentivo e amizade.

À Sílvia Celeste Sálvio, pela ajuda com as referências bibliográficas.

À Rosana Lugli, sempre muito amável ao me ajudar.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito dessa dissertação de mestrado.

"A persistência é o caminho do êxito."

*(Charles Chaplin)*



# RESUMO



A migrânea é uma cefaléia primária episódica com incidência mundial de 10% e alto impacto socioeconômico, afetando predominantemente as mulheres. Em 30% dos casos, as crises de migrânea são acompanhadas por sintomas neurológicos focais que caracterizam o fenômeno da aura. A fisiopatologia da migrânea continua sob investigação. Todavia, acredita-se tratar de um distúrbio neurovascular no qual a ativação de fibras aferentes do sistema trigeminovascular (TGVS) e a consequente liberação de óxido nítrico (NO) levariam à vasodilatação e neurotransmissão da dor durante a crise de migrânea. A formação de NO é atribuída à atividade de três isoformas de NO sintases (NOS): endotelial, neuronal e induzível, respectivamente eNOS, nNOS e iNOS e os genes que codificam tais enzimas exibem polimorfismos. Dessa forma, acredita-se que tais polimorfismos poderiam estar envolvidos na susceptibilidade à migrânea. No presente trabalho foi testada a hipótese de que dois polimorfismos clinicamente importantes no gene da iNOS: C<sup>-1026</sup>A (*rs2779249*) e G2087A (*rs2297518*) bem como a combinação de seus alelos em haplótipos estariam associados com a susceptibilidade à migrânea com e sem aura. Para tanto, foram estudadas 142 mulheres saudáveis (grupo controle) e 200 mulheres com migrânea, subdivididas em dois grupos: 148 pacientes com migrânea sem aura e 52 pacientes com migrânea com aura. Os genótipos e alelos foram determinados por PCR em tempo real utilizando o ensaio Taqman®. Os haplótipos foram inferidos através do programa PHASE versão 2.1. Os principais resultados do presente estudo indicam que o haplótipo H4, que combina o alelo A para os polimorfismos mencionados, pode estar associado à migrânea com aura enquanto o polimorfismo G2087A e o haplótipo H4 podem afetar a suscetibilidade à aura em pacientes com migrânea. Tais achados podem ter implicações terapêuticas ao se analisar os efeitos de possíveis inibidores seletivos da iNOS na população com esse perfil genotípico.



# **ABSTRACT**

Migraine is an episodic primary headache with worldwide incidence of 10% and high socioeconomic impact affecting mainly women. In 30% of cases, migraine attacks are followed by focal neurological symptoms that characterize the aura phenomenon. The migraine pathophysiology continues under investigation, although it is believed to consist of a neurovascular disorder in which the activation of afferent fibers of the trigeminovascular system (TGVS), leads to an nitric oxide (NO) release which, would be responsible for vasodilation and pain during migraine attacks. The formation of NO is attributed to the activity of three isoforms of NO synthases (NOS): endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS), and the genes that codify these enzymes exhibit polymorphisms. Thus, it is believed that these polymorphisms could be involved in the susceptibility to migraine. In this study, we tested the hypothesis that two clinically important iNOS gene polymorphisms: C<sup>-1026</sup>A (*rs2779249*) and G2087A (*rs2297518*), as well as the combination of their alleles in haplotypes, would be associated with migraine with or without aura. Therefore, we studied 142 healthy women (control group) and 200 women with migraine, who were subdivided into two groups: 148 with migraine without aura and 52 with migraine with aura. Genotypes and alleles were determined by real-time PCR, using the Taqman® assay. Haplotypes were inferred by the PHASE program (version 2.1). The main results of the present study indicate that H4 haplotype, which combines the A allele for both polymorphisms may be associated with migraine with aura, while G2087A polymorphism and H4 haplotype may affect the susceptibility to aura in patients with migraine. These findings may have therapeutic implications when analyzing the possible selective inhibitor effects of iNOS on the population with this genotype profile.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>CALCR</b>	Receptor de calcitonina
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDNRB</b>	Receptor de endotelina tipo B
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>eNOS</b>	Sintase endotelial do óxido nítrico
<b>ET-3</b>	Endotelina 3
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>IMC</b>	Índice de massa corpórea
<b>iNOS (NOS2A)</b>	Sintase induzida do óxido nítrico
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>L-NMMA</b>	L-nitromonometilarginina
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear <i>Kappa</i> B
<b>NKA</b>	Neuroquinina A
<b>nNOS</b>	Sintase neuronal do óxido nítrico
<b>NS</b>	Não significativo
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - polimorfismo de base única
<b>SP</b>	Substância P
<b>TACR1</b>	Receptor de Taquiquinina tipo 1
<b>TGVS</b>	Sistema Trigeminovascular

## LISTA DE TABELAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1-</b> Características clínicas e demográficas dos grupos estudados.....	39
<b>Tabela 2-</b> Frequências genotípicas e alélicas dos dois polimorfismos analisados para iNOS (sintase induzível de óxido nítrico) nos grupos controle, migrânea com aura e migrânea sem aura....	41
<b>Tabela 3-</b> Frequência de haplótipos estimados para os polimorfismos da iNOS (sintase induzível de óxido nítrico) nas participantes do grupo controle e com migrânea.....	42

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> Prevalência da migrânea com relação à idade, tanto em homens quanto em mulheres, na Europa.....	17
<b>Figura 2-</b> Evolução e fases do ataque de migrânea.....	19
<b>Figura 3-</b> Via molecular da inflamação neurogênica.....	21
<b>Figura 4-</b> Biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina pela ação das NO sintases.....	22

	Pág.
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1- INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
1.1- Epidemiologia da migrânea.....	16
1.2- Classificação e características clínicas da migrânea.....	18
1.3- Fisiopatologia da migrânea.....	19
1.4- O óxido nítrico.....	22
1.5- Os polimorfismos genéticos da iNOS.....	24
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3- CAPÍTULO</b> .....	28
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1- Genotipagem para os polimorfismos da iNOS.....	36
4.2- Análise estatística e estudo dos haplótipos da iNOS.....	37
<b>5- RESULTADOS</b> .....	38
<b>5- DISCUSSÃO GERAL</b> .....	43
<b>6- CONCLUSÃO GERAL</b> .....	48
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50
<b>8- ANEXO</b> .....	57



# **1- INTRODUÇÃO GERAL**



## 1.1- Epidemiologia da migrânea

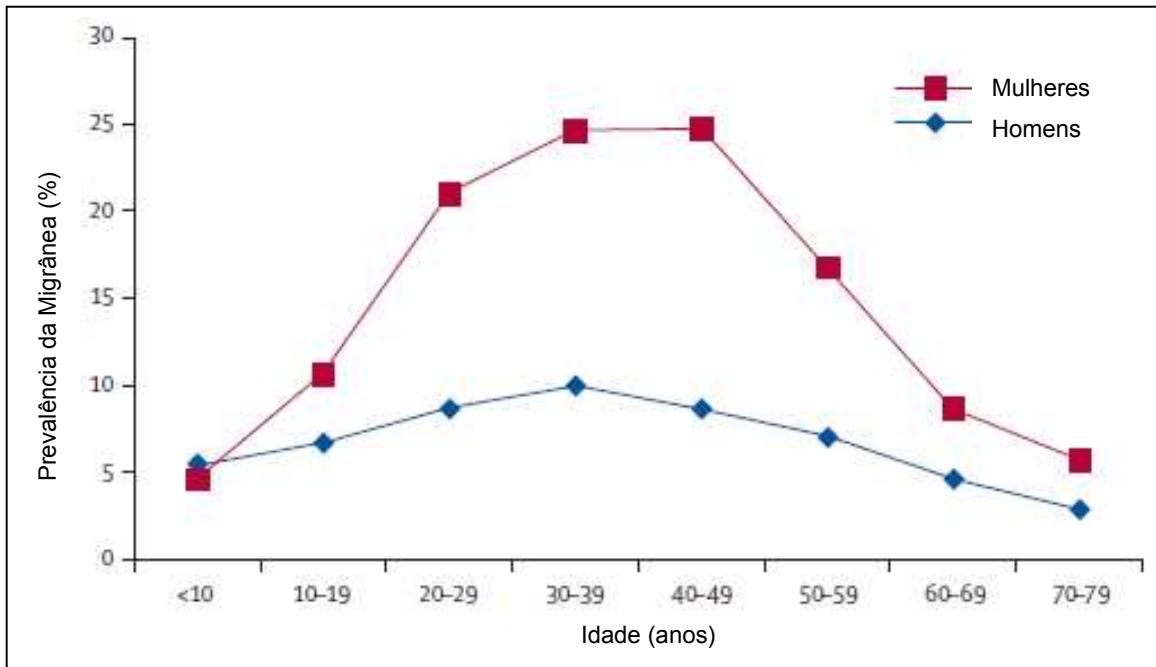
Em 1988 a Sociedade Internacional de Cefaleia publicou critérios operacionais para o diagnóstico de cefaleias. Tais critérios as subdividiram em dois grandes grupos: cefaleias primárias, cujas etiologias e mecanismos ainda não foram totalmente elucidados, e cefaleias secundárias, que podem ter como causa desde jejum prolongado até traumas cranianos<sup>(1,2)</sup>.

Dentre as cefaleias primárias, a migrânea, conhecida popularmente como enxaqueca, é considerada a mais importante devido à sua alta prevalência e impactos pessoais e socioeconômicos<sup>(3)</sup>. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a migrânea é classificada como a 19ª no ranking mundial dentre as doenças incapacitantes<sup>(4)</sup>.

Segundo critérios estabelecidos em 2004, a migrânea foi dividida em dois subtipos principais: Migrânea sem Aura e Migrânea com Aura<sup>(5)</sup>.

A incidência de migrânea na população mundial é de aproximadamente 10%, sendo mais prevalente na Europa e na América do Norte do que na África<sup>(6)</sup>.

A prevalência da migrânea é dependente de gênero e idade, tendo comportamento crescente até a quarta década de vida, a partir da qual começa a decair<sup>(6)</sup>. Apesar da migrânea ter incidência muito semelhante entre homens e mulheres antes da puberdade, na população adulta, a taxa de incidência atinge a proporção de três mulheres para cada homem (Figura 1)<sup>(6)</sup>.



**Figura 1-** Prevalência da migrânea com relação à idade, tanto em homens quanto em mulheres, na Europa<sup>(6)</sup>.

Estudo epidemiológico norte-americano revelou prevalência de 15 a 25% para o sexo feminino contra 6 a 8% para o masculino<sup>(7)</sup>. Evidências clínicas indicam que os hormônios sexuais femininos podem contribuir para essa discrepância de prevalência da migrânea entre gêneros na fase adulta. Prova disso são as descobertas de que baixos níveis de estrógeno e altos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH) podem estar associados à baixa prevalência de migrânea, conforme o observado na fase pós-menopausa, que se dá aproximadamente a partir da quinta década de vida da mulher<sup>(8)</sup>.

O impacto econômico da migrânea se deve aos custos diretos (medicação, consultas e hospitalização) e indiretos (absenteísmo e redução de eficiência no trabalho)<sup>(9)</sup>. Estudo epidemiológico conduzido nos Estados Unidos com dados de 1994 revelou que os custos diretos e indiretos com os quase 22 milhões de migranosos naquele país totalizaram mais de 14 bilhões de dólares.

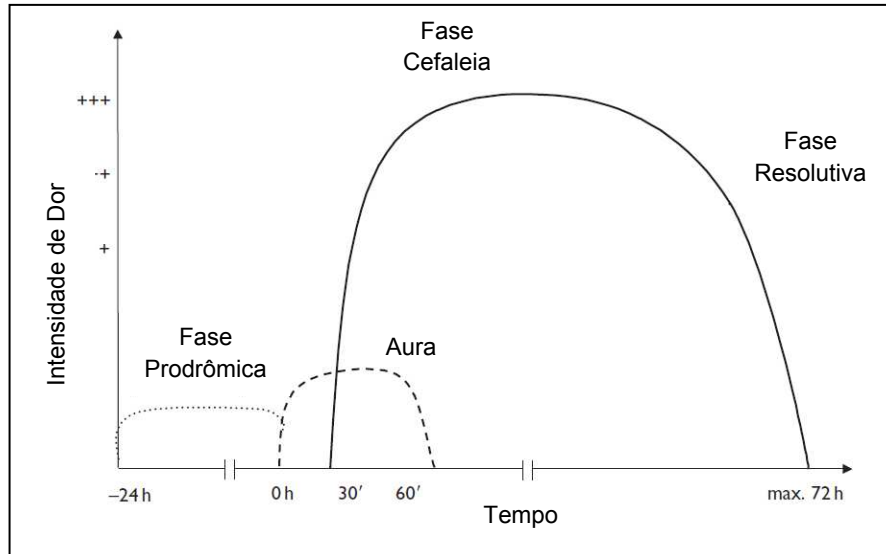
Na europa, com base em estudos de 2004 e 2005 publicados no European Journal of Neurology revelaram que o custo estimado por paciente com migrânea foi de 579 euros, ou seja, 27 bilhões de euros, considerando-se a estimativa de 41 milhões de pacientes na faixa da população entre 18 e 65 anos de idade<sup>(6)</sup>.

## **1.2- Classificação e características clínicas da migrânea**

A migrânea é um distúrbio neurovascular crônico e incapacitante caracterizado por ataques de cefaleia intensa, unilateral e pulsátil com duração de quatro a 72 horas. Esses sintomas podem ser acompanhados por anorexia, náusea, vômito, fono e/ou fotofobia e pioram com o esforço físico<sup>(10)</sup>. Em cerca de 30% dos pacientes, os ataques de migrânea ainda podem ser associados a distúrbios visuais uni ou bilaterais (linhas em zigue-zague, escotomas cintilantes e/ou palinopsia) ou motores (entorpecimento) que, em média, duram alguns minutos e não mais que uma hora. Tais distúrbios caracterizam o fenômeno da aura<sup>(3,11)</sup>. Esses pacientes representam 8% da população mundial<sup>(12)</sup>.

O fator desencadeante de uma crise de enxaqueca não é conhecido, mas vários fatores clínicos como a dieta, alteração no sono, depressão, exposição a odores fortes, estímulos luminosos intensos e o estresse podem predispor os indivíduos às crises<sup>(13)</sup>.

Eventualmente, 24 horas antes de seu início, o ataque de migrânea pode ser precedido por alterações no humor conhecidos como sintomas premonitórios tais como fome, sede, sonolência, bocejamento, que caracterizam a fase prodrômica do episódio. Em seguida, tem-se a evolução da fase de cefaleia, a qual pode ser antecedida e/ou associada à fase de aura. Por fim, quando a cefaleia da crise de migrânea tende a diminuir, chama-se esse período de fase resolutive (Figura 2)<sup>(14)</sup>.



**Figura 2-** Evolução e fases do ataque de migrânea<sup>(15)</sup>.

### 1.3- Fisiopatologia da migrânea

A despeito da falta de exatidão em sua etiologia, o conhecimento sobre a fisiopatologia da migrânea tem aumentado ao longo dos anos de modo que, baseado em sintomas clínicos, suas manifestações episódicas foram divididas em três fases: **i)** fase de excitabilidade neuronal ou “*trigger phase*”, **ii)** fase de aura, possivelmente relacionada com a Depressão Cortical Alastrante (CSD) e **iii)** fase da cefaléia, resultante da vasodilatação cranial causada pela ativação do sistema trigeminovascular<sup>(10)</sup>.

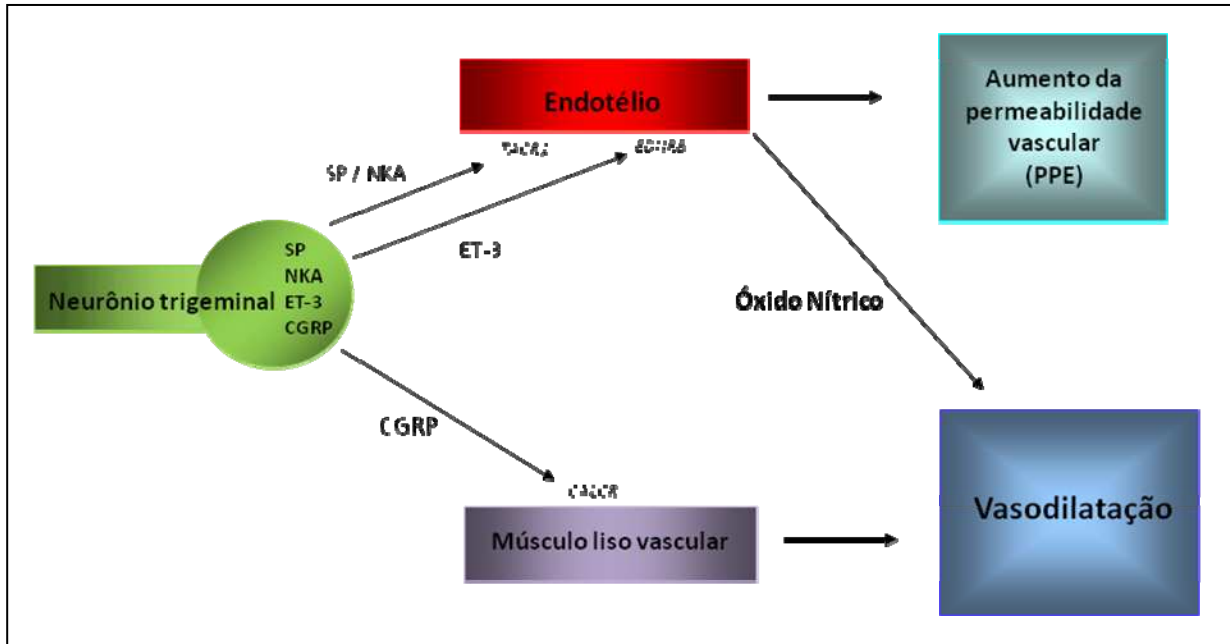
Pode-se afirmar que a CSD seria o evento fisiopatológico primário do ataque migranoso. A CSD caracteriza-se por uma onda de despolarização no córtex cerebral associada com aumento do fluxo sanguíneo regional. Após o evento da despolarização, segue-se uma supressão da atividade bioelétrica a qual se relaciona com uma redução do fluxo sanguíneo cortical. É durante a evolução desses eventos que o fenômeno da aura pode se estabelecer<sup>(7)</sup>. Em ratos observou-se que a depressão cortical alastrante foi responsável por alterações na composição do fluido extracelular no córtex cerebral, uma vez que foi observado aumento local da concentração de

substâncias como íons potássio, óxido nítrico (NO), ácido aracídico e prostaglandinas. Essas substâncias podem ativar e/ou sensibilizar os aferentes trigeminovasculares da meninge<sup>(16)</sup>.

Ainda que o fenômeno da aura esteja restrito a 30% dos migranosos, a CSD seria um evento comum às duas formas de migrânea. Uma possível explicação para a ausência dos sintomas da aura em migranosos sem aura seria o fato de a CSD se originar em uma região do córtex onde não haja estímulos visuais<sup>(7)</sup>.

Acredita-se que essa atividade anormal do córtex, que leva à CSD, promoveria a ativação de fibras sensoriais nociceptivas aferentes do sistema trigeminovascular (TGVS) que inervam os vasos sanguíneos cranianos levando ao evento da inflamação neurogênica.

A inflamação neurogênica caracteriza-se pelos eventos decorrentes da ativação dos neurônios trigeminais a qual leva à liberação de neuropeptídeos tais como a substância P (SP), endotelina-3 (ET-3), neuroquinina A (NKA) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os três primeiros atuam em receptores das células endoteliais levando à liberação de óxido nítrico (NO), promovendo aumento da permeabilidade vascular, que permite o extravasamento de plasma, degranulação de mastócitos e a consequente liberação de agentes pró-inflamatórios tais como citocinas, prostaglandinas, histamina e bradicinina. Já o CGRP atua no músculo liso vascular levando diretamente à vasodilatação. Dessa forma, observa-se que a inflamação neurogênica da migrânea consiste de dois braços fisiológicos: **i)** extravasamento de plasma e **ii)** vasodilatação, sendo que nesse último há contribuição direta da musculatura lisa vascular e indireta do endotélio, através da liberação de NO (Figura 3). Todo esse processo inflamatório também pode ativar neurônios nociceptivos uma vez que a sensibilização de vias relacionadas à dor no sistema nervoso central, a nível medular e talâmico, seria causada pela geração de NO ou estaria associada a ela<sup>(10,17,18,19,20,21)</sup>.



**Figura 3-** Via molecular da inflamação neurogênica. Adaptado de<sup>(18)</sup> SP, substância P; NKA, neuroquinina A; ET-3, endotelina-3; CGRP, Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; TACR1, receptor de Taquiquinina 1; EDNRB, receptor de endotelina tipo B; CALCR, receptor de calcitonina; PPE, Extravasamento de proteína plasmática)

### 1.3.1- Genética e migrânea

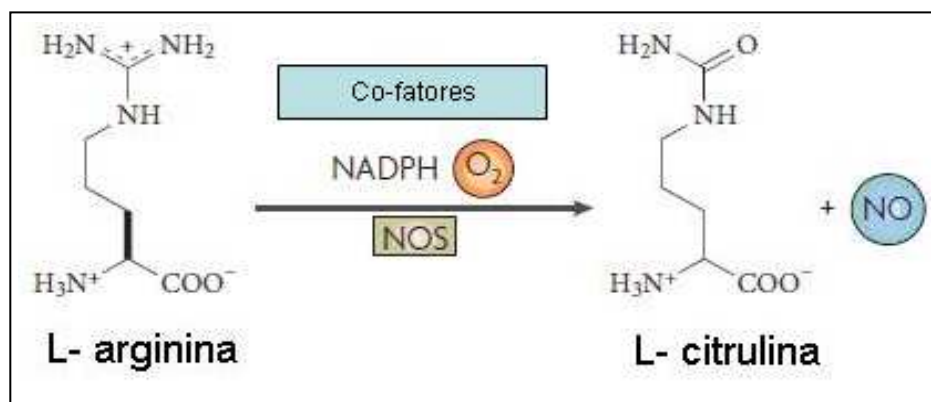
Na migrânea, há um componente genético forte<sup>(23)</sup>. Exemplo disso foi a descoberta de importantes mutações em canais iônicos em alguns pacientes com migrânea com aura.

O primeiro gene descrito, *CACNA1A*, codifica a subunidade  $\alpha_1$  do canal de cálcio voltagem-dependente do tipo P/Q. Posteriormente, foi identificado um segundo gene localizado no cromossomo 1, denominado *ATP1A2*, que codifica a subunidade  $\alpha_2$  da bomba sódio/potássio e, por fim, o gene *SCN1A* que codifica um canal de sódio voltagem dependente. Variações nestes genes alterariam o transporte de neurotransmissores, tais como a serotonina e de íons, tais como o

$K^+$ , no cérebro que poderiam levar a um aumento da excitabilidade no córtex cerebral e predispor pacientes a ataques de migrânea<sup>(24)</sup>.

#### 1.4- O óxido nítrico e a migrânea

O óxido nítrico, menor produto bioativo de células mamíferas, é biossintetizado em uma grande variedade de tipos celulares a partir do aminoácido arginina pela ação das enzimas NO sintases (NOS) (Figura 4) as quais apresentam três isoformas: neural (n-NOS, NOS1), induzível (i-NOS, NOS2) e endotelial (e-NOS, NOS3)<sup>(25)</sup>. Ele é encontrado sob a forma gasosa com meia vida aproximada de 5-30 segundos, apresentando ainda características como a alta reatividade e penetrabilidade nas membranas biológicas<sup>(26)</sup>.



**Figura 4-** Biossíntese do óxido nítrico a partir da L-arginina pela ação das NO sintases<sup>(27)</sup>.

O NO tem participação em vários fenômenos fisiológicos, muitos dos quais relacionados com a fisiopatologia da migrânea<sup>(28)</sup> conforme se pode observar no evento da vasodilatação neurogênica, por exemplo<sup>(29)</sup>. Além de seu papel no controle do tônus vascular, o NO é responsável pela neurotransmissão nociceptiva no sistema nervoso central<sup>(30)</sup>.

Dessa forma, alguns autores têm reportado que uma hiperatividade da via L-arginina-NO poderia estar relacionada com uma maior predisposição à migrânea<sup>(31)</sup>. Indício dessa relação é demonstrado por estudo no qual pacientes com migrânea tratados com nitroglicerina (GTN), droga doadora de NO, apresentaram cefaleia tardia semelhante àquela apresentada durante o ataque de migrânea sem aura<sup>(32)</sup>. Outro dado que também evidencia a relação entre a formação anormal de NO e a fisiopatologia da migrânea foi que o bloqueio das NOS através da administração de L-nitromonometilarginina (L-NMMA) mostrou ser eficiente no combate aos ataques de migrânea sem aura<sup>(32)</sup>.

Outra evidência do envolvimento do NO na fisiopatologia da migrânea foi demonstrada a partir de experimento em que altas concentrações de nitritos, derivados do NO, foram encontradas no plasma de pacientes migranosos com e sem aura no período entre as crises<sup>(31)</sup>.

Por fim, estudo investigativo feito com pacientes portadores de migrânea sem aura, mostrou aumento da expressão de iNOS nas 6 primeiras horas do ataque de migrânea associado a aumento da atividade de NF- $\kappa$ B<sup>(47)</sup>.

#### 1.4.1- A sintase induzível de óxido nítrico - iNOS

Dentre as NO sintases, a iNOS é a única que se expressa rapidamente e em quantidade relativamente grande como resposta a estímulo pró-inflamatório<sup>(2)</sup>. Citocinas, endotoxinas e outros agentes podem induzir sua produção, por essa razão diz-se que a regulação de sua atividade enzimática é cálcio-independente. Já a eNOS e a nNOS são enzimas constitutivas, produzidas em condições fisiológicas, em menor quantidade e dependentes de altas quantidades de íons cálcio para serem ativas<sup>(28,33,34)</sup>. Na fisiologia cardiovascular, especificamente, a L-arginina é convertida em NO pela ação da eNOS contida nas células endoteliais e nNOS, nas células gliais do cérebro<sup>(35)</sup>. Entretanto, em processos patológicos de doenças cardiovasculares, como no choque séptico, por exemplo, quando estimulada em outras situações, a iNOS, cuja localização se



dá numa ampla gama de células, é capaz de produzir cerca de 1000 vezes mais NO que a eNOS e nNOS<sup>(32,33,25)</sup>.

Outro fator que torna a iNOS diferenciada é quanto a biossíntese de óxido nítrico. Tanto a nNOS quanto a eNOS produzem NO de maneira pulsátil, enquanto a iNOS, após ser induzida, em condições inflamatórias, o produz de maneira contínua até ser degradada<sup>(34)</sup>.

A regulação da iNOS se dá primariamente ao nível de expressão gênica, por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. O gene da iNOS humana está localizado no cromossomo 17 e inclui 27 éxons<sup>(2)</sup>. A região promotora do gene tem sido estudada e relacionada com diversas doenças<sup>(36)</sup>, apesar de a região codificadora também ser alvo de estudos de associação<sup>(2)</sup>.

### **1.5- Os polimorfismos genéticos da iNOS e a migrânea**

Qualquer *locus* no qual existam alelos múltiplos presentes em uma frequência maior que 1% na população é definido como polimórfico. A classe mais comum de polimorfismo genético são os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), gerados a partir de mudanças em nucleotídeos únicos de uma determinada sequência de DNA (Ácido Desoxirribonucleico)<sup>(37)</sup>.

Diferentes polimorfismos foram encontrados no gene da iNOS, tanto na região promotora como na região codificadora. Polimorfismos na região promotora podem afetar a taxa de transcrição do gene, enquanto que na região codificadora alteram a atividade do produto<sup>(2)</sup>.

Como exemplo, o SNP funcional da região promotora, C-1026A, que envolve a presença do nucleotídeo citosina ou adenina na posição -1026 do gene está associado com hipertensão em população chinesa<sup>(38)</sup>. Já o SNP encontrado no éxon 16, G2087A, caracterizado pela troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 2087, parece estar relacionado à susceptibilidade de doenças como câncer de próstata, Linfoma não-Hodgkin e pré-eclâmpsia.

Nesse SNP do éxon, a troca das bases nitrogenadas ocasiona a alteração do aminoácido serina por leucina na posição 608 da enzima iNOS. Por isso, esse polimorfismo é também designado como S608L<sup>(39,40,41)</sup>.

Especificamente com relação à migrânea, apenas dois estudos associativos com resultados discrepantes foram realizados relacionando polimorfismos da região promotora do gene da iNOS com a susceptibilidade à doença<sup>(42,43)</sup>.

No presente trabalho, estudaremos se os polimorfismo G2087A do éxon 16 e C-1026A, na região promotora, do gene da iNOS estão relacionados com a susceptibilidade a migrânea com e sem aura.

Este polimorfismo é do tipo SNP, ou seja, representa apenas a troca de um único nucleotídeo, neste caso uma adenina por uma guanina (A>G) o que, por sua vez, resulta na alteração de um aminoácido Serina por Leucina na enzima iNOS. Atualmente, a influência desse polimorfismo já foi estudada em doenças inflamatórias intestinais, câncer de próstata, câncer gástrico e pré-eclampsia, mas aparentemente nunca em migrânea, o que salienta a importância do presente trabalho.



## **2- OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram investigar a existência de associação entre migrânea, com e sem aura, e dois polimorfismos genéticos da enzima sintase induzível do óxido nítrico (iNOS): C<sup>-1026</sup>A (*rs2779249*) e G2087A (*rs2297518*). Adicionalmente, foi investigado se os haplótipos que incluem esses dois SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) estão associados à migrânea com e sem aura.



## **3- CAPÍTULO**

## Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with migraine and aura

Thiago de O. S. Mansur · Flavia M. Gonçalves ·  
Alisson Martins-Oliveira · Jose G. Speciali · Fabiola Dach ·  
Riccardo Lacchini · Jose E. Tanus-Santos

Received: 19 October 2011 / Accepted: 4 January 2012 / Published online: 11 January 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

**Abstract** Migraine is a complex neurological disorder with a clear neurogenic inflammatory component apparently including enhanced nitric oxide (NO) formation. Excessive NO amounts possibly contributing to migraine are derived from increased expression and activity of inducible NO synthase (iNOS). We tested the hypothesis that two functional, clinically relevant *iNOS* genetic polymorphisms (C<sup>-1026</sup>A—rs2779249 and G2087A—rs2297518) are associated with migraine with or without aura. We studied 142 healthy women without migraine (control group) and 200 women with migraine divided into two groups: 148 with migraine without aura (MWA) and 52 with aura (MA). Genotypes were determined by real-time polymerase chain reaction using the Taqman<sup>®</sup> allele discrimination assays. The PHASE 2.1 software was used to estimate the haplotypes. The A allele for the G2087A polymorphism was more commonly found in the MA group than in the MWA group (28 vs. 18%;  $P < 0.05$ ). No other significant differences in the alleles or genotypes distributions were found ( $P > 0.05$ ). The haplotype combining both A alleles for the two polymorphisms was more commonly found in the MA group than in the control group

or in the MWA group (19 vs. 10 or 8%;  $P = 0.0245$  or  $0.0027$ , respectively). Our findings indicate that the G2087A and the C<sup>-1026</sup>A polymorphism in the *iNOS* gene affect the susceptibility to migraine with aura when their effects are combined within haplotypes, whereas the G2087A affects the susceptibility to aura in migraine patients. These finding may have therapeutic implications when examining the effects of selective iNOS inhibitors.

**Keywords** Haplotype · Inducible nitric oxide synthase · Migraine · Polymorphism

### Introduction

Migraine is a complex neurological disorder predominantly affecting women [1]. This disease typically involves recurrent attacks of severe headache associated with nausea, vomiting, phonophobia, and photophobia, which are preceded by transient neurologic symptoms known as aura in some cases [2]. Propelling research efforts have been justified because this common clinical condition is now recognized as an established risk factor for cardiovascular disease and ischemic stroke [3–5]. While the pathogenic mechanisms involved in migraine are under investigation [6, 7], there is now evidence showing that genetic factors play a role in this disease [8, 9].

There is a clear neurogenic inflammatory component in migraine, which involves the blood vessels and produces pain [10]. This inflammatory component apparently includes enhanced nitric oxide (NO) formation, and previous studies showed that infusion of a NO donor drug induced a migraine-like headache in healthy subjects [11]. Moreover, a NO synthase (NOS) inhibitor exerted anti-migraine effects, consistent with the idea that abnormal

T. de O. S. Mansur · F. M. Gonçalves  
Department of Pharmacology, State University of Campinas,  
Campinas, SP, Brazil

A. Martins-Oliveira · R. Lacchini · J. E. Tanus-Santos (✉)  
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine  
of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes,  
3900, Ribeirao Preto, SP 14049-900, Brazil  
e-mail: tanus@fmrp.usp.br; tanussantos@yahoo.com

J. G. Speciali · F. Dach  
Division of Neurology, Department of Neuroscience,  
Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University  
of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil

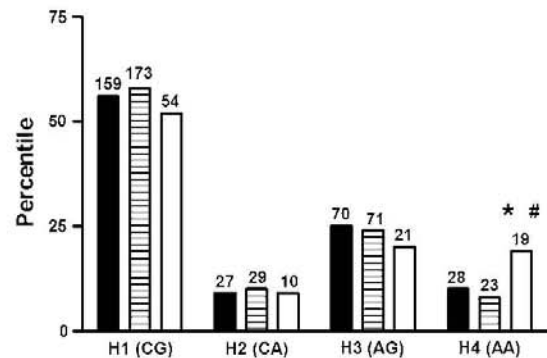
NO formation contributes to the pathophysiology of migraine [12]. In this respect, while NO formation is mostly attributed to the activity of three different NOS (endothelial, neuronal, and inducible NOS; eNOS, nNOS, and iNOS, respectively), it is possible that the excessive NO amounts possibly contributing to migraine are derived from increased expression and activity of iNOS [13].

Although iNOS is mainly regulated at the transcriptional level [14], only two previous studies have examined whether genetic polymorphisms in the promoter region of the *iNOS* gene are associated with variable susceptibility to migraine [15, 16]. In this study, we tested the hypothesis that two potentially functional, clinically relevant *iNOS* genetic polymorphisms (the C<sup>-1026</sup>A polymorphism—rs2779249 in the promoter region, and the G2087A polymorphism—rs2297518 in exon 16) are associated with migraine with or without aura. While no previous study has examined whether these two polymorphisms are associated with migraine, these polymorphisms have been associated with hypertensive disorders [17–19] or with malignant neoplasias [20, 21]. In addition, we have also examined whether *iNOS* haplotypes (combinations of genetic markers within a particular region) are associated with these neurological conditions. This haplotype approach is important because analyzing combinations of genetic markers in a particular region of interest (haplotypes) may provide improved genetic information than testing the effects of genetic markers one by one [22–24].

## Materials and methods

### Subjects

This study was approved by the Ethics Committee at Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil, and each subject provided written informed consent. All the participants underwent a complete medical history and physical examination. We studied 142 healthy women without migraine (control group) and 200 women with migraine divided into two groups: 148 women with migraine without aura (MWA group) (Fig. 1), and 52 women with migraine with aura (MA group). Migraine was diagnosed according to the International Classification of Headache Disorders criteria [25]. All the migraine patients were enrolled at the Headache Clinic of the Division of Neurology, University Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirao Preto. The control group included healthy women randomly selected from the local population and unrelated to the patients. Ethnicity was defined as self-reported in this study [26, 27]. Women with history of cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, pulmonary, endocrine, oncological, auto-immune, respiratory, inflammatory, and



**Fig. 1** Percentile distribution of haplotypes in controls (black bars), in patients with migraine without aura (MWA: hatched bars) and in patients with migraine with aura (MA: open bars). The numbers above the bars indicate the estimated number of haplotypes corresponding to each bar. \* $P = 0.0245$  for MA versus controls. # $P = 0.0027$  for MA versus MWA

psychiatric diseases were excluded from the study. Furthermore, patients with neurological diseases or other kinds of headache were also excluded from the study.

Venous blood samples were collected into vacutainer plastic tubes (Becton–Dickinson, Brazil) containing sodium/potassium EDTA at the time of clinic attendance. The genomic DNA was extracted from the cellular component of 1 ml of whole blood through salting-out method and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analyzed.

### Genotyping for iNOS polymorphisms

Two clinically relevant polymorphisms in the *iNOS* gene were studied: the C<sup>-1026</sup>A (rs2779249) and the G2087A (rs2297518). Genotypes for these polymorphisms were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR), using the Taqman<sup>®</sup> allele discrimination assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). TaqMan PCR was performed in a total volume of 12  $\mu\text{l}$  (3 ng of DNA, 1 $\times$  TaqMan master mix, 1 $\times$  assay mix, 900 nM of each primer and 200 nM of each probe) placed in 96-well PCR plates.

The probes and primers used in the genotyping for the C<sup>-1026</sup>A polymorphism were customized as follows: primer forward 5'-GCCTCTCAAAGTGCTAGGATTACA A-3', primer reverse 5'-GGGAATACTGTATTCAGGC ATTATAAGGA-3', and probes 5'-TAGCCAC[A/C]ATG CCG-3'. Probes and primers used in the genotyping of G2087A were designed by Applied Biosystems (part number C\_11889257-10). Fluorescence from PCR amplification was detected using StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and analyzed with manufacturer's software.



### Statistical analysis and study of *iNOS* haplotypes

The clinical characteristics of study groups were compared by the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s multiple comparison test (StatView for Windows, Cary, NC, USA). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. A value of  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. The categorical variables were compared between groups by Fisher’s tests.

The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium, and differences in the genotypic and allelic frequencies of each polymorphism between the groups were also assessed using  $\chi^2$  tests. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

The Bayesian statistical-based program PHASE (version 2.1, <http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>) was used to estimate the haplotypes frequencies in each group [28]. The possible haplotypes including genetic variants for the *iNOS* polymorphisms studied (C or A variants for the C<sup>-1026</sup>A polymorphism, and G or A variants for the G2087A polymorphism) were: H1 (CG), H2 (CA), H3 (AG), and H4 (AA). Differences between groups in haplotype frequency distributions were further tested using a contingency table.

### Results

The clinical characteristics of the 342 women enrolled in this study are summarized in Table 1. We found no differences in age, body mass index, and in ethnicity when the control, the MWA and the MA groups were compared (Table 1;  $P > 0.05$ ). While we found no significant differences with respect to intensity and duration of attacks (Table 1;  $P > 0.05$ ), only minor differences were found with respect to the frequency of attacks, and patients with 5–10 attacks/month were more commonly found in the MA group than in the MWA group (Table 1;  $P < 0.05$ ).

The frequencies of *iNOS* genetic variants for the two polymorphisms are shown in Table 2. The distribution of genotypes for each polymorphism studied here showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium.

We found a significant disparity in the distribution of alleles for the G2087A polymorphism among the study groups (Table 2), and the A allele for this polymorphism was more commonly found in the MA group than in the MWA group (28 vs. 18; Table 2;  $P = 0.0243$ ), without significant differences between the MWA group or the MA group and the control group ( $P > 0.05$ ; Table 2). If we consider a correction of  $P$  value for two comparisons (2 polymorphisms), the significant differences with respect to

**Table 1** Demographic characteristics of study participants

Parameters	Controls ( <i>N</i> = 142)	MWA ( <i>N</i> = 148)	MA ( <i>N</i> = 52)
Age (years)	36.5 $\pm$ 1.02	38.2 $\pm$ 0.99	40.0 $\pm$ 1.45
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.6 $\pm$ 0.47	26.5 $\pm$ 0.62	26.1 $\pm$ 1.01
Ethnic (%white)	69	62	58
Familial history (%)	–	68	80
Frequency (%)			
1–3/month	–	12	14
3–5/month	–	18	8
5–10/month	–	13	28*
10–15/month	–	25	18
>15/month	–	33	32
Intensity (%)			
Mild	–	0	4
Moderate	–	34	28
Severe	–	66	68
Duration (%)			
<12 h	–	15	14
12–24 h	–	19	14
>24 h	–	66	72
Headache free (%)	–	51	56

BMI body mass index, MWA migraine without aura, MA migraine with aura

Values are the mean  $\pm$  SEM or percentage number of subjects

\*  $P < 0.05$  MWA versus MA group

A allele frequencies in the MA and MWA groups is still significant ( $P < 0.05/2 = 0.025$ ). In line with these results, when we combined the GA and AA genotypes for the G2087A polymorphism, we found these genotypes at significantly increased frequency in the MA group compared with the MWA (48 vs. 32%;  $P = 0.0349$ ). No other significant differences in the alleles or genotypes distributions were found ( $P > 0.05$ ; Table 2).

We estimated *iNOS* haplotypes frequencies in the three study groups (Table 3). While similar haplotypes distributions were found in the MWA and in the control group ( $P > 0.05$ ), the H4 haplotype (which combines both A alleles for the two polymorphisms) was more commonly found in the MA group than in the control group (19 vs. 10%;  $P = 0.0245$ ; Table 3), although this may be a borderline finding that may not resist to correction for multiple haplotype comparisons. Moreover, we found that this haplotype (H4) was significantly more common in the MA group than in the MWA group (19 vs. 8%;  $P = 0.0027$ ; Table 3).



**Table 2** Genotype and allele frequencies for iNOS (inducible nitric oxide synthase) polymorphisms in the control and migraine groups

Polymorphism	Genotype or allele	Control (N = 142) (%)	MWA (N = 148) (%)	P <sup>a</sup>	OR <sup>b</sup> (95% CI)	MA (N = 52) (%)	P <sup>c</sup>	OR <sup>d</sup> (95% CI)	P <sup>e</sup>	OR <sup>f</sup> (95% CI)
C <sup>-1026</sup> A	CC	62 (44)	65 (44)		1.00 (Ref.)	21 (41)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)
	CA	62 (44)	72 (49)	NS	1.11 (0.68–1.80)	22 (42)	NS	1.05 (0.52–2.10)	NS	0.95 (0.48–1.88)
	AA	18 (12)	11 (7)		0.58 (0.25–1.33)	9 (17)		1.48 (0.58–3.78)		2.53 (0.92–6.95)
	C	186 (65)	202 (68)	NS	1.00 (Ref.)	64 (62)	NS	1.00 (Ref.)	NS	1.00 (Ref.)
	A	98 (35)	94 (32)		0.88 (0.62–1.25)	40 (38)		1.19 (0.75–1.89)		1.34 (0.84–2.14)
G2087A	GG	92 (65)	101 (68)		1.00 (Ref.)	27 (52)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)
	GA	45 (32)	42 (28)	NS	0.85 (0.51–1.41)	21 (40)	NS	1.59 (0.81–3.12)	NS	1.87 (0.95–3.67)
	AA	5 (3)	5 (4)		0.91 (0.26–3.25)	4 (8)		2.73 (0.68–10.9)		2.99 (0.75–11.9)
	G	229 (81)	244 (82)	NS	1.00 (Ref.)	75 (72)	NS	1.00 (Ref.)	0.02*	1.00 (Ref.)
	A	55 (19)	52 (18)		0.89 (0.58–1.35)	29 (28)		1.61 (0.96–2.71)		1.81 (1.08–3.06)*

MWA migraine without aura, MA migraine with aura, OR odds ratio, CI confidence interval, NS not significant

\*  $P < 0.05$

<sup>a</sup>  $P$  value for control versus MWA

<sup>b</sup> OR for control versus MWA

<sup>c</sup>  $P$  value for control versus MA

<sup>d</sup> OR for control versus MA

<sup>e</sup>  $P$  value for MWA versus MA

<sup>f</sup> OR for MWA versus MA

**Table 3** Estimated haplotypes frequencies for iNOS (inducible nitric oxide synthase) polymorphisms in the control and migraine women

Haplotype	Control (N = 284) (%)		MWA (N = 296) (%)	P <sup>a</sup>	OR <sup>b</sup> (95% CI)	MA (N = 104) (%)	P <sup>c</sup>	OR <sup>d</sup> (95% CI)	P <sup>e</sup>	OR <sup>f</sup> (95% CI)	
	C <sup>-1026</sup> A	G2087A									
H1	C	G	159 (56)	173 (58)	NS	1.00 (Ref.)	54 (52)	NS	1.00 (Ref.)	NS	1.00 (Ref.)
H2	C	A	27 (9)	29 (10)	NS	0.99 (0.56–1.74)	10 (9)	NS	1.09 (0.49–2.40)	NS	1.11 (0.51–2.41)
H3	A	G	70 (25)	71 (24)	NS	0.93 (0.63–1.38)	21 (20)	NS	0.88 (0.49–1.57)	NS	0.95 (0.53–1.68)
H4	A	A	28 (10)	23 (8)	NS	0.76 (0.42–1.37)	19 (19)	0.0245	1.99 (1.03–3.86)	0.0027	2.65 (1.34–5.22)

MWA migraine without aura, MA migraine with aura, OR odds ratio, CI confidence interval, NS not significant

<sup>a</sup>  $P$  value for control versus MWA

<sup>b</sup> OR for Control versus MWA

<sup>c</sup>  $P$  value for control versus MA

<sup>d</sup> OR for control versus MA

<sup>e</sup>  $P$  value for MWA versus MA

<sup>f</sup> OR for MWA versus MA

## Discussion

The most important findings of this study were that the H4 haplotype (which combines both A alleles) was associated with migraine with aura, whereas the A allele for the G2087A polymorphism and the H4 haplotype were associated with increased susceptibility to aura in patients with migraine. Together, these findings suggest that the A allele for the G2087A polymorphism predisposes to aura in migraine patients, and that this allele combined with the A

allele for the C<sup>-1026</sup>A polymorphism increases the susceptibility to migraine with aura.

Our results are novel and therefore we cannot directly compare them with previous studies. There are only two previous studies examining whether iNOS gene polymorphisms are associated with migraine, and while one study reported significant association [16], the other study showed no association [15]. However, our positive findings reported here are supported by previous studies providing a strong rationale linking increased iNOS activity with

migraine [13]. Although iNOS is mainly regulated at the transcriptional level [14], the increased frequency that we found for the A allele for the G2087A polymorphism in patients with aura is consistent with increased iNOS activity in such patients. In fact, this genetic polymorphism leads to an amino acid substitution from serine to leucine in exon 16 results, which apparently increases iNOS activity and possibly promotes excessive NO formation and inflammation in the presence of the A allele [20], although these possibilities remain to be proved. Thus, the significant association of the A allele with aura is possibly explained by increased iNOS activity in subjects carrying the A allele for the G2087A polymorphism. In line with this suggestion, this polymorphism affected the susceptibility to other diseases with an inflammatory component (diabetes, prostate cancer, non-Hodgkin lymphoma, and preeclampsia) [17, 20, 21, 29].

While the A allele for the C<sup>-1026</sup>A polymorphism was associated with approximately fivefold increases in iNOS promoter transcriptional activity compared with the C allele [19], this polymorphism had no significant effects in this study, at least when taking into consideration the effects of this single polymorphism. However, it is very interesting that the H4 haplotype, which combines both A alleles for the two iNOS gene polymorphism, was associated with aura in migraine patients. This finding is very important and is consistent with the idea that this particular haplotype combining both A alleles probably is associated with the highest iNOS activity [19, 20]. However, we have not examined molecular mechanisms in this study, and this suggestion remains to be proved. Moreover, although it is possible that genetic markers may have combined effects within haplotypes, we found no significant linkage disequilibrium between the two polymorphisms studied here (data not shown; all  $P < 0.05$ ). However, this information may not be very reliable because the subjects being studied here were not randomly selected from general population.

Our findings are relevant because they may help to identify patients at increased risk of developing migraine with aura, which may benefit from the therapy of selective iNOS inhibitors. Given the relevance of NO to migraine, previous studies were designed to examine the effects of non-selective NOS inhibitors, and significant reductions in pain intensity were reported with a non-selective NOS inhibitor [30]. The initial favorable results have led to the idea that selective iNOS inhibitors could promote better effects than non-selective NOS inhibitors. While a recent study showed no beneficial effects with the use of selective iNOS inhibitors [31], iNOS genotypes were not determined for these patients. It is reasonable to expect that iNOS inhibitors may have much improved responses in subjects with genetic markers associated with increased iNOS

expression and activity. However, it remains to be determined whether iNOS genotypes or haplotypes could help to define a particular group of patients that would benefit from the use of selective iNOS inhibitors.

In conclusion, our results indicate that the G2087A and the C<sup>-1026</sup>A polymorphism in the iNOS gene affect the susceptibility to migraine with aura when their effects are combined within haplotypes, whereas the G2087A affects the susceptibility to aura in migraine patients. These findings may have therapeutic implications when examining the effects of selective iNOS inhibitors.

**Acknowledgments** This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## References

- Jensen R, Stovner LJ (2008) Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 7(4):354–361
- Pietrobon D, Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4(5):386–398
- Bigal ME, Kurth T, Santanello N, Buse D, Golden W, Robbins M, Lipton RB (2010) Migraine and cardiovascular disease: a population-based study. *Neurology* 74(8):628–635
- Dalkara T, Nozari A, Moskowitz MA (2010) Migraine aura pathophysiology: the role of blood vessels and microembolisation. *Lancet Neurol* 9(3):309–317
- Kurth T, Schurks M, Logroscino G, Buring JE (2009) Migraine frequency and risk of cardiovascular disease in women. *Neurology* 73(8):581–588
- Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Izidoro-Toledo TC, Luizon MR, Dach F, Tanus-Santos JE (2010) Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and haplotypes in women with migraine. *DNA Cell Biol* 29(7):357–362
- Martins-Oliveira A, Speciali JG, Dach F, Marcaccini AM, Goncalves FM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE (2009) Different circulating metalloproteinases profiles in women with migraine with and without aura. *Clin Chim Acta* 408(1–2):60–64
- Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Silva PS, Dach F, Tanus-Santos JE (2011) Endothelial nitric oxide synthase haplotypes associated with aura in patients with migraine. *DNA Cell Biol* 30(6):363–369
- Stam AH, van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM, Ferrari MD (2008) Genetics of migraine: an update with special attention to genetic comorbidity. *Curr Opin Neurol* 21(3):288–293
- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD (2002) Migraine—current understanding and treatment. *N Engl J Med* 346(4):257–270
- Olesen J (2008) The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol Ther* 120(2):157–171
- Olesen J (2010) Nitric oxide-related drug targets in headache. *Neurotherapeutics* 7(2):183–190
- Sarchielli P, Floridi A, Mancini ML, Rossi C, Coppola F, Baldi A, Pini LA, Calabresi P (2006) NF-kappaB activity and iNOS expression in monocytes from internal jugular blood of migraine without aura patients during attacks. *Cephalalgia* 26(9):1071–1079
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine–nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329(27):2002–2012



15. Lea RA, Curtain RP, Shepherd AG, Brimage PJ, Griffiths LR (2001) No evidence for involvement of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in susceptibility to typical migraine. *Am J Med Genet* 105(1):110–113
16. Jia S, Ni J, Chen S, Jiang Y, Dong W, Gao Y (2011) Association of the pentanucleotide repeat polymorphism in NOS2 promoter region with susceptibility to migraine in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 30(2):117–122
17. Amaral LM, Palei AC, Sandrim VC, Luizon MR, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE (2011) Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy. *J Hum Hypertens*. doi:10.1038/jhh.2011.65
18. Li W, Liu H, Fu L, Li D, Zhao Y (2010) Identification of Yin Yang 1-interacting partners at -1026C/A in the human iNOS promoter. *Arch Biochem Biophys* 498(2):119–126
19. Fu L, Zhao Y, Lu J, Shi J, Li C, Liu H, Li Y (2009) Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. *J Hypertens* 27(5):991–1000
20. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W, Lan Q, Welch R, Chanock SJ, Rothman N (2006) Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis* 27(9):1828–1834
21. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Chanock S, Huang WY, Hayes RB (2009) Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 30(4):621–625
22. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE (2008) eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics* 9(10):1467–1473
23. Sandrim VC, Palei AC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE (2010) eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics* 10(1):40–45
24. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE (2010) Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 16(7):506–510
25. HCSotIH Society (2004) The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24(Suppl 1):9–160
26. Lacchini R, Metzger IF, Luizon M, Ishizawa M, Tanus-Santos JE (2010) Interethnic differences in the distribution of matrix metalloproteinases genetic polymorphisms are consistent with interethnic differences in disease prevalence. *DNA Cell Biol* 29(11):649–655
27. Metzger IF, Sandrim VC, Tanus-Santos JE (2012) Endogenous nitric oxide formation correlates negatively with circulating matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 levels in black subjects. *Mol Cell Biochem* 360(1–2):393–399
28. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978–989
29. Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsen AE, Nemp J (2001) Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2792–2796
30. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, Olesen J (1998) Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia* 18(1):27–32
31. Hoivik HO, Laurijssens BE, Harnisch LO, Twomey CK, Dixon RM, Kirkham AJ, Williams PM, Wentz AL, Lunnon MW (2010) Lack of efficacy of the selective iNOS inhibitor GW274150 in prophylaxis of migraine headache. *Cephalalgia* 30(12):1458–1467



## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

Foram estudadas 142 mulheres saudáveis (grupo controle) e 200 mulheres com migrânea as quais foram subdivididas em dois grupos: 148 pacientes com migrânea sem aura (grupo MWA) e 52 pacientes com migrânea com aura (grupo MA). O diagnóstico de migrânea foi feito de acordo com os critérios estabelecidos pela Classificação Internacional das Cefaleias<sup>(3)</sup>. Todas as pacientes com migrânea foram selecionadas no Ambulatório de Cefaleia e Algias Craniofaciais da Divisão de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto. O grupo controle foi constituído por mulheres saudáveis selecionadas aleatoriamente na população local e sem qualquer relação com as pacientes do estudo. Mulheres com histórico de doença cardiovascular, renal, hepática, gastrointestinal, pulmonar, endócrina, oncológica, autoimune, respiratória, inflamatória ou psiquiátrica foram excluídas do estudo. Pacientes portadoras de outras doenças neurológicas bem como de outros tipos de cefaleias foram também excluídas do estudo.

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos plásticos vacutainer (Becton-Dickinson, Brasil) contendo sódio/potássio EDTA. O DNA genômico foi extraído da fração celular contida em 1 mL de sangue total e em seguida armazenado a -20°C para posterior análise.

#### **4.1- Genotipagem para os polimorfismos da iNOS**

Foram estudados dois polimorfismos clinicamente importantes no gene da iNOS: C<sup>-1026</sup>A (*rs2779249*) e G2087A (*rs2297518*). Os genótipos para esses polimorfismos foram determinados através da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) em Tempo Real, utilizando-se o sistema Taqman® para discriminação de alelo (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). O TaqMan PCR foi realizado num volume total 12µL (3ng de DNA, 1 x TaqMan master mix, 1 x mix de ensaio, 900nM de cada primer e 200nM de cada sonda) e distribuídos em 96 poços.

Para o polimorfismo C<sup>-1026</sup>A, as sondas e primers foram preparados da seguinte forma: primer direto 5'-GCCTCTCAAAGTGCTAGGATTACAA-3', primer reverso 5'-GGGAATACTGTATTTTCAGGCATTATAAGGA-3', e sonda 5'-TAGCCAC[A/C]ATGCCCG-3'. As sondas e primers utilizados na genotipagem do polimorfismo G2087A foram produzidos pela Applied Biosystems (part number C\_11889257-10). A fluorescência da amplificação do PCR foi detectada utilizando-se StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e analisada com o software do fabricante.

#### 4.2- Análise estatística e estudo dos haplótipos da iNOS

As características clínicas de cada grupo do estudo foram comparadas pelo teste de *Kruskall-Wallis* e em seguida pelo teste de comparação de Dunn (StatView para Windows, Cary, NC, EUA). As variáveis de categoria foram comparadas entre os grupos pelo teste de Fisher.

A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi avaliada para desvio em relação ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e as diferenças nas frequências genotípica e alélica de cada polimorfismo entre os grupos foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado. Valor de  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Para estimar as frequências haplotípicas em cada grupo foi utilizado o software de inferência bayesiana PHASE (versão 2.1, [www.stat.washington.edu/stephens/software.html](http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html))<sup>(23)</sup>. Os possíveis haplótipos incluindo as variações genéticas para os polimorfismos da *iNOS* estudados (variantes C ou A para o polimorfismo C<sup>-1026</sup>A, e variantes G ou A para o polimorfismo G2087A) foram: H1 (CG), H2 (CA), H3 (AG) e H4 (AA). As diferenças na distribuição de frequência haplotípica entre os grupos foram também testadas utilizando uma tabela de contingência.



## **5- RESULTADOS**

As características clínicas das 342 mulheres incluídas no estudo estão resumidas na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças étnicas, de idade, ou de IMC quando o grupo controle foi comparado com os grupos migrânea sem aura e migrânea com aura. (Tabela 1;  $P>0.05$ ). Enquanto não foram encontradas diferenças significantes com relação à intensidade e duração dos ataques de migrânea (Tabela 1;  $P>0.05$ ), somente pequenas diferenças foram encontradas com relação à frequência dos ataques, e pacientes com 5-10 ataques/mês foram mais comumente encontradas no grupo MA do que no grupo MWA (Tabela 1;  $P<0.05$ ).

**Tabela 1-** Características clínicas e demográficas dos grupos estudados

Parâmetros	Controle (N=142)	MWA (N=148)	MA (N=52)
Idade (anos)	36.5±1.02	38.2±0.99	40.0±1.45
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.6±0.47	26.5±0.62	26.1±1.01
Etnicidade (%branco)	69	62	58
História familiar (%)	-	68	80
<b>Frequência (%)</b>			
1-3/mês	-	12	14
3-5/mês	-	18	8
5-10/mês	-	13	28*
10-15/mês	-	25	18
>15/mês	-	33	32
<b>Intensidade (%)</b>			
Leve	-	0	4
Moderada	-	34	28
Grave	-	66	68
<b>Duração (%)</b>			
<12 horas	-	15	14
12-24 horas	-	19	14
>24 horas	-	66	72
Livre de cefaleia (%)	-	51	56

**IMC-** índice de massa corpórea; **MWA-** migrânea sem aura; **MA-** migrânea com aura. Valores expressos como médias ± DPM ou % do número de participantes. \* $P<0.05$  grupo MWA vs. grupo MA.



A frequência de variações genéticas da iNOS para os dois polimorfismos estão mostradas na Tabela 2. A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo estudado não apresentaram desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foi encontrada disparidade significativa na distribuição de alelos para o polimorfismo G2087A entre os grupos estudados (Tabela 2), e o alelo "A" para este polimorfismo foi mais encontrado no grupo MA do que no grupo MWA (28% *contra* 18%; Tabela 2;  $P < 0.05$ ) Em consonância com esses resultados, quando foram associados os genótipos GA e AA para o polimorfismo G2087A, tais genótipos estavam significativamente aumentados no grupo MA em comparação com o grupo MWA (48% *contra* 32%;  $P = 0.0349$ ). Nenhuma outra diferença significativa na distribuição de alelos ou de genótipos foi encontrada. ( $P > 0.05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2-** Frequências genotípicas e alélicas dos dois polimorfismos analisados para iNOS (sintase induzível de óxido nítrico) nos grupos controle, migrânea com aura e migrânea sem aura

Polimorfismo	Genótipo/alelo	Controle (N=142)	MWA (N=148)	P <sup>a</sup>	OR <sup>a</sup> (95%CI)	MA (N=52)	P <sup>b</sup>	OR <sup>b</sup> (95%CI)	P <sup>c</sup>	OR <sup>c</sup> (95%CI)
<b>C<sup>-1026</sup>A</b>	CC	62 (44%)	65 (44%)		1.00 (Ref.)	21 (41%)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)
	CA	62 (44%)	72 (49%)	0,303	1.11 (0.68-1.80)	22 (42%)	0,705	1.05 (0.52-2.10)	0,123	0.95 (0.48-1.88)
	AA	18 (12%)	11 (7%)		0.58 (0.25-1.33)	9 (17%)		1.48 (0.58-3.78)		2.53 (0.92-6.95)
	C	186 (65%)	202 (68%)	0,482	1.00 (Ref.)	64 (62%)	0,471	1.00 (Ref.)	0,213	1.00 (Ref.)
	A	98 (35%)	94 (32%)		0.88 (0.62-1.25)	40 (38%)		1.19 (0.75-1.89)		1.34 (0.84-2.14)
<b>G2087A</b>	GG	92 (65%)	101 (68%)		1.00 (Ref.)	27 (52%)		1.00 (Ref.)		1.00 (Ref.)
	GA	45 (32%)	42 (28%)	0,819	0.85 (0.51-1.41)	21 (40%)	0,192	1.59 (0.81-3.12)	0,084	1.87 (0.95-3.67)
	AA	5 (3%)	5 (4%)		0.91 (0.26-3.25)	4 (8%)		2.73 (0.68-10.9)		2.99 (0.75-11.9)
	G	229 (81%)	244 (82%)	0,577	1.00 (Ref.)	75 (72%)	0,071	1.00 (Ref.)	0,024*	1.00 (Ref.)
	A	55 (19%)	52 (18%)		0.89 (0.58-1.35)	29 (28%)		1.61 (0.96-2.71)		1.81 (1.08-3.06)*

**MWA**-migrânea sem aura; **MA**-migrânea com aura; **OR**-odds ratio; **CI**-intervalo de confiança; **NS**-não significativo.

**P<sup>a</sup>**- valor de P para Controle *versus* MWA. **P<sup>b</sup>**- Valor de P para Controle *versus* MA. **P<sup>c</sup>**- valor de P para MWA *versus* MA.

**OR<sup>a</sup>**- OR para Controle *versus* MWA. **OR<sup>b</sup>**- OR para Controle *versus* MA. **OR<sup>c</sup>**- OR para MWA *versus* MA.

\*P<0.05

Foram estimadas as frequências haplotípicas da *iNOS* nos três grupos de estudo (Tabela 3). Enquanto foi observada distribuição similar de haplótipos nos grupos MWA e no grupo controle ( $P>0.05$ ), o haplótipo H4 (que combina ambos os alelos “A” para os dois polimorfismos estudados) foi mais comumente encontrado no grupo MA quando comparado ao grupo controle (19% versus 10%;  $P=0.0245$ ; Tabela 3), apesar de este achado ser incerto e não poder ser sustentável à correção para comparações de haplótipos múltiplos. Além disso, foi observado que este haplótipo (H4) foi significativamente mais comum no grupo MA que no grupo MWA (19% versus 8%;  $P=0.0027$ ; Tabela 3).

**Tabela 3-** Frequência de haplótipos estimados para os polimorfismos da *iNOS* (sintase induzível de óxido nítrico) nas participantes do grupo controle e com migrânea.

Haplótipo			Controle (N=284)	MWA (N=296)	P <sup>a</sup>	OR <sup>a</sup> (95%CI)	MA (N=104)	P <sup>b</sup>	OR <sup>b</sup> (95%CI)	P <sup>c</sup>	OR <sup>c</sup> (95%CI)
C <sup>-1026</sup>	A	2087A									
H1	C	G	159 (56%)	173 (58%)	0.5494	1.00 (Ref.)	54 (52%)	0.4762	1.00 (Ref.)	0.2481	1.00 (Ref.)
H2	C	A	27 (9%)	29 (10%)	0.9058	0.99 (0.56-1.74)	10 (9%)	0.9743	1.09 (0.49-2.40)	0.9571	1.11 (0.51-2.41)
H3	A	G	70 (25%)	71 (24%)	0.8527	0.93 (0.63-1.38)	21 (20%)	0.3589	0.88 (0.49-1.57)	0.4290	0.95 (0.53-1.68)
H4	A	A	28 (10%)	23 (8%)	0.3745	0.76 (0.42-1.37)	19 (19%)	0.0245*	1.99 (1.03-3.86)	0.0027*	2.65 (1.34-5.22)*

**MWA-** migrânea sem aura; **MA-** migrânea com aura; **OR-** odds ratio; **CI-** intervalo de confiança; **NS-** não significativo.

**P<sup>a</sup>-** valor de P para Controle *versus* MWA. **P<sup>b</sup>-** valor de P para Controle *versus* MA. **P<sup>c</sup>-** valor de P para MWA *versus* MA.

**OR<sup>a</sup>-** OR para Controle *versus* MWA. **OR<sup>b</sup>-** OR para Controle *versus* MA. **OR<sup>c</sup>-** OR para MWA *versus* MA.

\* $P<0.05$



## **6- DISCUSSÃO GERAL**

Apesar de a migrânea ainda não ter seu exato mecanismo fisiopatológico completamente elucidado<sup>(44,45)</sup>, há forte evidência da participação do óxido nítrico (NO) nas crises da doença<sup>(32)</sup>.

Embora a biossíntese cerebral de NO parecer estar associada à eNOS e nNOS e de existirem inibidores seletivos para essas duas isoformas testados com sucesso, apenas a concentração de iNOS parece estar aumentada durante as crises de migrânea<sup>(46)</sup>.

Sob essa óptica, estudar os polimorfismos genéticos da sintase induzida de óxido nítrico pode explicar as causas da suposta hiperativação da via L-arginina-NO presente durante as crises de migrânea.

Nesse ponto, os achados mais importantes do presente estudo foram que o haplótipo H4, que combina o alelo A para o polimorfismo C<sup>-1026</sup>A com o alelo A do polimorfismo G2087A, foi associado com migrânea com aura e que o alelo A para o polimorfismo G2087A e o haplótipo H4 foram associados à susceptibilidade aumentada para aura em pacientes com migrânea. Sendo assim, pode-se dizer que tais achados permitem levantar a hipótese de que o alelo A para o polimorfismo do éxon 16, isoladamente pode estar relacionado com a maior susceptibilidade à aura em pacientes migranosos e quando combinado com o alelo A do polimorfismo C<sup>-1026</sup>A, no haplótipo H4, aumentaria a susceptibilidade à migrânea com aura.

Há apenas dois estudos prévios que examinaram a associação entre polimorfismos da iNOS e migrânea. Um deles reportou associação significativa<sup>(43)</sup> enquanto o outro não mostrou associação<sup>(42)</sup>.

Os resultados do presente estudo são novos, sendo assim não podem ser comparados diretamente com estudos prévios. Todavia, os resultados positivos encontrados para a referida associação tem suporte de estudos que provam a ligação entre aumento da atividade da iNOS com a migrânea<sup>(47)</sup>.

Embora a iNOS seja principalmente regulada a nível transcricional, isto é, na região promotora do gene<sup>(48,49)</sup>, a frequência aumentada encontrada para o alelo A do polimorfismo G2087A em pacientes com migrânea com aura é consistente com o aumento da atividade da iNOS nesses pacientes. De fato, esse polimorfismo genético leva a alteração de uma serina por uma leucina no aminoácido 608 da iNOS, o que aparentemente aumenta a atividade enzimática da iNOS e possivelmente promove formação excessiva de NO e inflamação<sup>(39)</sup>. Todavia, essas possibilidades ainda necessitam ser provadas.

Sendo assim, a associação significativa do alelo A com a aura migranosa é possivelmente explicada pelo aumento da atividade da iNOS em pacientes que carregam o alelo A para o polimorfismo G2087A. Em consonância com essa sugestão, esse polimorfismo do gene da iNOS afetou a susceptibilidade para outras doenças com um componente inflamatório tais como diabetes, câncer de próstata, linfoma não Hodking e pré-eclampsia<sup>(41,39,40,50)</sup>.

Apesar de o alelo A para o polimorfismo C<sup>-1026</sup>A ter sido associado com um aumento de aproximadamente cinco vezes na atividade transcricional promotora da iNOS quando comparado ao alelo C<sup>(38)</sup>, esse polimorfismo não teve efeitos significantes no presente estudo, pelo menos quando analisado isoladamente. Porém, é interessante observar que o haplótipo H4, que combina ambos os alelos A para os dois polimorfismos do gene da iNOS, foi associado com aura em pacientes com migrânea. Este achado é importante e consistente com a ideia de que esse haplótipo em particular está associado com a atividade elevada da iNOS<sup>(38,39)</sup>.

A interação de múltiplos polimorfismos genéticos em um haplótipo representa informação genética mais determinante na susceptibilidade a uma doença do que a avaliação de polimorfismos isolados<sup>(51)</sup>. Entretanto, no presente estudo não foram examinados mecanismos moleculares e tal associação ainda continua por ser provada. Além do mais, embora seja possível que marcadores genéticos possam ter efeitos combinados em haplótipos, não foi encontrado

desequilíbrio de ligação significativa entre os dois polimorfismos estudados, dado que as pacientes do presente estudo não foram selecionadas aleatoriamente na população em geral, o que torna essa informação não confiável.

Apesar de o CGRP ser um importante vasodilatador presente na inflamação neurogênica, há evidência de que o NO co-localiza-se com o CGRP nos gânglios trigeminais em humanos, fato que incorpora o NO na fisiologia da migrânea<sup>(52)</sup>.

Dada a importância do NO na migrânea, estudos prévios foram feitos com o objetivo de examinar os efeitos de inibidores não seletivos de NOS e os resultados na redução da intensidade da cefaleia foram significativos<sup>(53)</sup>. Dessa forma, tais resultados positivos levaram à ideia de que inibidores seletivos de iNOS poderiam promover efeitos ainda melhores. Outros fatos que concorrem para tal ideia são que (i) apesar de não ser normalmente detectável, a iNOS expressa em células gliais pode, quando estimulada, produzir NO em quantidade mil vezes maior que aquela produzida pela eNOS e nNOS<sup>(54)</sup> e (ii) a nNOS, isoforma constitutivamente neural, co-localiza-se com o CGRP em uma minoria de neurônios<sup>(55)</sup>.

Todavia sobre tal suposição, estudos recentes demonstraram não haver efeitos benéficos com o uso de inibidores seletivos de iNOS,<sup>(56)</sup> porém, os pacientes tratados não tiveram seus genótipos determinados. Por isso seria aceitável a ideia de que os inibidores seletivos da iNOS poderiam ter respostas melhores em sujeitos com marcadores genéticos associados a aumento na atividade e expressão da iNOS, apesar de que permanece indeterminado se os genótipos ou haplótipos da iNOS poderiam ajudar a definir um grupo particular de pacientes que se beneficiariam com o uso de inibidores específicos de iNOS.

Atualmente, as crises agudas de migrânea são tratadas com drogas anti-inflamatórias não esteroidais (ácido acetilsalicílico), triptanos (5-HT<sub>1B/1D/1F</sub> agonistas) ou dihidroergotamina<sup>(57)</sup> intranasal entretanto, 20-30% dos pacientes não respondem à essas terapias. Além disso, os agentes para prevenção de

migrânea, incluindo antagonistas dos receptores beta adrenérgicos, ácido valpróico, amitripitilina e flunarizina também se mostraram insatisfatórios em muitos pacientes<sup>(57)</sup>. Dessa maneira, novas estratégias terapêuticas se fazem necessárias<sup>(7)</sup>.

Sendo assim, devido à escassez de novas drogas para a migrânea na última década, sobretudo para o tratamento sintomático da doença, a via L-arginina-NO aparece como possível alvo farmacológico alternativo a ser explorado pela indústria farmacêutica<sup>(23)</sup>.

Por isso, os achados do presente estudo são relevantes porque podem ajudar a identificar pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento de migrânea com aura, os quais poderiam se beneficiar de terapias com inibidores seletivos de iNOS.





## **7- CONCLUSÃO GERAL**

As investigações feitas demonstraram que os polimorfismos C<sup>-1026</sup>A e o G2087A no gene da iNOS podem afetar a suscetibilidade à migrânea com aura quando seus efeitos estão em combinação nos seus haplótipos, sendo que o polimorfismo G2087A pode afetar a suscetibilidade à aura em pacientes com migrânea. Tais achados podem ter implicações terapêuticas ao se analisar os efeitos de possíveis inibidores seletivos da iNOS na população com o perfil genotípico observado.



## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1- Speciali JG, Silva WF. Cefaleias. São Paulo: Lemos Editorial; 2002. 493p.
- 2- Qidwai T, Jamal F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2010;72(5):375-87.
- 3- Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2007;13(1):39-44.
- 4- IHS - The International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders, 2<sup>nd</sup> ed. *Cephalalgia.* 2004;24(suppl.1):1-160.
- 5- IHS - The International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. *Cephalalgia.* 2005;25:460-65.
- 6- Jensen R, Stovner L. Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol.* 2008;7(4):354-61.
- 7- Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(5):386-98.
- 8- Wang SJ, Fuh JL, Lu SR, Juang KD, Wang PH. Migraine prevalence during menopausal transition. *Headache.* 2003;43:470-8.
- 9- Hu XH, Markson LE, Lipton RB, Stewart WF, Berger ML. Burden of migraine in the United States: disability and economic costs. *Arch Intern Med.* 1999;159(8):813.
- 10- Gupta S. Vascular Pharmacology of Migraine and Preeclampsia: problems of the fair sex. [Doctoral thesis] Rotterdam: Erasmus University Rotterdam; 2006.
- 11- D'Andrea G, Colavito D, Carbonare M, Leon A. Migraine with aura: conventional and non-conventional treatments. *Neurol Sci.* 2011;32 (Suppl 1): 121-9.
- 12- Schott GD. Exploring the visual hallucinations of migraine aura: the tacit contribution of illustration. *Brain* 2007;130 (6):1690-1703.

- 13- Rogawski MA. Common pathophysiologic mechanisms in migraine and epilepsy. *Arch Neurol.* 2008;65(6):709-14.
- 14- HIS - Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia.*1988;8(7):1-96.
- 15- Jelencsik I, Ertsey C. Migraine. In: Keri G, Toth I. *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research.* London, Taylor & Francis, 334-49.
- 16- Strassman A, Raymond S, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *NATURE.*1996;384(6609):560-4.
- 17- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 2002;22;54-61.
- 18- Peroutka SJ. Neurogenic inflammation and migraine: implications for the therapeutics. *Mol Interv.* 2005;5(5):302-11.
- 19- Waeber C, Moskowitz MA. Therapeutic implications of central and peripheral neurologic mechanisms in migraine. *Neurol.* 2003;61(8suppl.4):s9-s20.
- 20- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience.* 2000;96(2):351-57.
- 21- Galletti F, Cupini LM, Corbelli I, Calabresi P, Sarchielli P. Pathophysiological basis of migraine prophylaxis. *Prog Neurobiol.* 2009;89(2):176-92.
- 22- Crueter FM. Pathophysiology of Migraine. *Semin Neurol.* 2010;30(2):120-30.
- 23- de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet.* 2009;126(1):115-32.
- 24- Silberstein SD. Migraine. *Lancet.* 2004;363:381-91.
- 25- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010;23(2):75-93.

- 26- Kiechle F, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Pathol.* 1993;100(5):567-75.
- 27- Calabrese V, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):766-75.
- 28- Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
- 29- Rand MJ. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992;19(3):147-69.
- 30- Meller S, Gebhart G. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain.* 1993;52(2):127-36.
- 31- D'amico D, Ferraris A, Catania A, Carlin A, Grazi L, Bussone G. Increased plasma nitrites in migraine and cluster headache patients in interictal period: basal hyperactivity of L-arginine-NO pathway. *Cephalalgia.* 2002;22(1):33-6.
- 32- Olesen J. Nitric Oxide-Related Drug Targets in Headache. *Neurotherapeutics.* 2010;7(2):183-90.
- 33- Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995;221(3):220-35.
- 34- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-50.
- 35- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, et al. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:1251-56.

- 36- Barcellos LF, et al. Genetic variation in nitric oxide synthase 2A (NOS2A) and risk for multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2008;9(6):493-500.
- 37- Thompson & Thompson. *Genética Médica*. 6ª edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2002.
- 38- Fu L, et al. Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. *J Hypertens.* 2009;27(5):991-1000.
- 39- Wang SS, Davis S, Cerhan J, Hartge P, Severson R, Cozen W, et al. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis.* 2006;27(9):1828-34.
- 40- Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis.* 2009;30(4):621-5.
- 41- Amaral LM, Palei AC, Sandrim VC, Luizon MR, Cavalli RC, Duarte G, et al. Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy. *J Hum Hypertens.* 2011:1-6. doi: 10.1038/jhh.2011.65. [Epub ahead of print]
- 42- Lea RA, Curtain RP, Shepherd AG, Brimage PJ, Griffiths LR. No evidence for involvement of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in susceptibility to typical migraine. *Am J Med Genet.* 2001;105(1):110-13.
- 43- Jia S, Ni J, Chen S, Jiang Y, Dong W, Gao Y. Association of pentanucleotide repeat polymorphism in NOS2 promoter region with susceptibility to migraine in a chinese population. *DNA Cell Biol.* 2011;30(2):30:117-22.
- 44- Martins-Oliveira A, Speciali JG, Dach F, Marcaccini AM, Gonçalves FM, Gerlach RF, et al. Different circulating metalloproteinases profiles in women with migraine with and without aura. *Clin Chim Acta.* 2009;408(1-2):60-4.

- 45- Gonçalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Izidoro-Toledo TC, Luizon MR, Dach F, et al. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and haplotypes in women with migraine. *DNA Cell Biol.* 2010;29(7):357-62.
- 46- Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol.* 2002;51(4):507-16.
- 47- Sarchielli P, Floridi A, Mancini ML, Rossi C, Coppola F, Baldi A, et al. NF-kappaB activity and iNOS expression in monocytes from internal jugular blood of migraine without aura patients during attacks. *Cephalalgia.* 2006;26(9):1071-9.
- 48- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;30;329(27):2002-12.
- 49- Mansur TOS, Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Dach F, Lacchini R, et al (2012). Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with migraine and aura. *Mol Cell Biochem.* doi:10.1007/s11010-11012-11231-11010.
- 50- Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsen AE, Nerup J. Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2792-6.
- 51- Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303-20.
- 52- Tajti J, Uddman R, Möller S, Sundler F, Edvinsson L. Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *J Auton Nerv Syst.* 1999;28;76(2-3):176-83.
- 53- Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, et al. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia.* 1998;18(1):27-32.



54- Brenan K, Charles A. An Update on the blood vessel in migraine. *Curr Opin Neurol.* 2010;23:266-74.

55- Edvinsson L, Mulder H, Goadsby PJ, Uddman R. Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: Cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide. *J Auton Nerv Syst.* 1998;70(1-2):15-22.

56- Høivik HO, Laurijssens BE, Harnisch LO, Twomey CK, Dixon RM, Kirkham AJ, et al. Lack of efficacy of the selective iNOS inhibitor GW274150 in prophylaxis of migraine headache. *Cephalalgia.* 2010;30:1458-67.

57- Snow V, Weiss K, Wall EM, Mottur-Pilson C. Pharmacologic management of acute attacks of migraine and prevention of migraine headache. *Ann Intern Med.* 2002;137(10):840-9.



## **9- ANEXO**



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCRP - FMRP-USP

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 07 de novembro de 2007.

Ofício N°. 3999/2007  
CEP/ EGS

**PROCESSO HCRP N°. 6120/2007**

**Prezado Professor,**

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 258ª Reunião Ordinária, realizada em 05/11/2007, tomou ciência e aprovou o adendo (conforme parecer anexo) referente à pesquisa "FARMACOGENÉTICA DA ENXAQUECA: RELEVÂNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS PARA A SUSCEPTIBILIDADE E TRATAMENTO DA ENXAQUECA". **O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.**

Atenciosamente,

**PROF. DR. EDSON GARCIA SOARES**  
Membro Titular do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor  
**PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS**  
Departamento de Farmacologia - FMRP-USP

---

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário  
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186  
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br  
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP