



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA ROSANA DE SOUZA FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES DE CGRP, OCITOCINA E ÓXIDO NÍTRICO NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM MIGRÂNEA**

RECIFE

2022

MARIA ROSANA DE SOUZA FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES DE CGRP, OCITOCINA E ÓXIDO NÍTRICO NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM MIGRÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia química para a saúde.

Orientador: Marcelo Moraes Valença

Coorientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Ferreira, Maria Rosana de Souza

Concentrações de CGRP, ocitocina e óxido nítrico no líquido ceforraquidiano em pacientes com migrânea / Maria Rosana de Souza Ferreira – 2022.

89 f. : il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Moraes Valença

Coorientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Migrânea 2. Biomoléculas 3. Óxido nítrico I. Valença, Marcelo Moraes (orient). II. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (coorient.) III. Título

616.84912

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-166

MARIA ROSANA DE SOUZA FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES DE CGRP, OCITOCINA E ÓXIDO NÍTRICO NO LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM MIGRÂNEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21/ 06/ 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Juliana Ramos de Andrade (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mário Fernando Pietro Peres (Examinador Externo)
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Arão Belitardo de Oliveira (Examinador Externo)
Danish Headache Center

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria do Socorro e Severino Martins.

AGRADECIMENTOS

Confesso que foi um longo caminho. Mas tudo se torna mais leve quando temos pessoas queridas que nos alegram com uma palavra de conforto e incentivo.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e à Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de realizar o doutorado. Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE e ao Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde desenvolvi grande parte dos experimentos da pesquisa.

Agradeço aos meus orientadores Marcelo Valença e Danyelly Bruneska, por todo apoio, incentivo e aprendizado durante cada etapa dessa tarefa. Ao professor Antunes-Rodrigues, da FMRP-USP, por sempre disponibilizar o seu laboratório para realização de experimentos.

Agradeço aos amigos que conheci na Universidade e levarei comigo sempre, André Pukey e Rosane Galvão, obrigada por todo incentivo. À Isabella Ralph que sempre esteve disposta a ajudar.

Às minhas amigas Rita Reis e Bertandrelli Leopoldino, que sempre acreditaram em mim. Foram muitos momentos de dificuldades, superação, alegrias e vitórias juntas! Sem vocês teria sido tudo mais difícil. Dedico também às suas famílias que sempre me receberam de braços abertos.

À minha família, meus pais, Socorro Souza e Severino Martins, por todo suporte e incentivo prestado em todas as fases de minha vida; ao meu irmão Rodrigo Ferreira; à minha avó Maria Alves, por ser uma pessoa doce e tornar a vida mais leve; à minha prima Suzana Pereira e ao seu filhote Gabriel Pereira, com quem convivi quase todos os dias. Agradeço a Silas Lyns por ser amigo, parceiro e ter acreditado em mim na construção dessa etapa.

A Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram com a minha trajetória, bem como com toda minha formação profissional e pessoal.

“Se escutar uma voz dentro de você dizendo 'Você não é um pintor', então pinte sem parar, de todos os modos possíveis, e aquela voz será silenciada.”

Vincent Van Gogh

RESUMO

A migrânea, doença neurológica mais prevalente no mundo, ficando atrás apenas da cefaleia tensional, é caracterizada por crises de dor de cabeça, muitas vezes unilateral e latejante, com uma maior sensibilidade visual à luz, auditiva aos sons e ao movimento, com sensações vertiginosas. Uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, a migrânea gera gastos sanitários anuais estimados em mais de US\$ 9 bilhões no Brasil. Várias biomoléculas estão envolvidas na fisiopatologia das crises de migrânea, gerando a ativação de alguns núcleos neuronais, incluindo o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico. Essas biomoléculas que participam na gênese de uma crise de migrânea são também encontradas no LCR, que circula pelo espaço subaracnóideo com íntima relação com o sistema nervoso central e parte do sistema nervoso periférico. Um componente importante do sistema trigêmeino-vascular é a dura-máter com suas artérias meníngeas e rica inervação trigeminal. Evidências sugerem que o fenômeno da dor está intimamente relacionado com liberação de CGRP, por outro lado, ocitocina parece exercer um papel inibitório durante fenômenos álgicos. O óxido nítrico participa no controle de inúmeras funções no sistema nervoso central, como um importante neuromodulador. Neste estudo, objetivou-se mensurar as concentrações do CGRP, ocitocina e óxido nítrico no LCR de pacientes que iriam se submeter a uma punção lombar para procedimentos de rotina durante uma raquianestesia (ou bloqueio subaracnóideo). Visando comparar um grupo controle de pacientes sem migrânea com um grupo formado apenas de migranosos, os pacientes foram divididos em indivíduos com migrânea e um grupo controle, de ambos os sexos. As amostras foram coletadas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A quantificação das moléculas foi realizada por meio de Elisa, radioimunoensaio e quimiluminescência. Foram avaliadas amostras de 27 pacientes, dos quais 12 foram incluídos no grupo migrânea, dentre eles 9 mulheres. Os níveis de CGRP em mulheres com migrânea e do grupo controle foi de $0,09 \pm 0,3$ versus $0,10 \pm 0,02$ pg/ml, e nos homens $0,09 \pm 0,01$ versus $0,08 \pm 0,01$ pg/ml. A concentração de ocitocina no grupo migrânea foi $0,41 \pm 0,33$ versus $0,42 \pm 0,21$ pg/ml no grupo de mulheres e nos homens $0,24 \pm 0,12$ versus $0,33 \pm 0,21$ pg/ml. O óxido nítrico no grupo de mulheres com migrânea teve média de $20,37 \pm 19,2$ versus $13,08 \pm 7,92$ pg/ml, nos homens a média foi de $11,67 \pm 2,10$ versus $11,47 \pm 6,78$ pg/ml. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações das substâncias e os grupos avaliados. Embora não tenham sido demonstradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos comparados, este estudo foi o primeiro a correlacionar os níveis de substâncias envolvidas na modulação da dor no LCR de pacientes com migrânea.

Palavras-chave: Migrânea. LCR. Ocitocina. CGRP. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Migraine, the most prevalent neurological disease in the world, second only to tension headache, is characterized by attacks of headache, often unilateral and throbbing, with greater visual sensitivity to light, auditory to sounds and movement, with vertiginous sensations. One of the main causes of disability worldwide, migraine generates annual health expenses estimated at more than US\$ 9 billion in Brazil. Several biomolecules are involved in the pathophysiology of migraine attacks, generating the activation of some neuronal nuclei, including the central nervous system and the peripheral nervous system. These biomolecules that participate in the genesis of a migraine attack are also found in the CSF, which circulates through the subarachnoid space with a close relationship with the central nervous system and part of the peripheral nervous system. An important component of the trigeminal-vascular system is the dura mater with its meningeal arteries and rich trigeminal innervation. Evidence suggests that the phenomenon of pain is closely related to the release of CGRP, on the other hand, oxytocin seems to exert an inhibitory role during pain phenomena. Nitric oxide participates in the control of numerous functions in the central nervous system as an important neuromodulator. In this study, we aimed to measure the concentrations of CGRP, oxytocin, and nitric oxide in the CSF of patients who would undergo a lumbar puncture for routine procedures during spinal anesthesia (or subarachnoid block). In order to compare a control group of patients without migraine with a group formed only of migraineurs, the patients were divided into individuals with migraine and a control group of both sexes. The samples were collected at the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. The quantification of molecules was performed by means of Elisa, radioimmunoassay, and chemiluminescence. Samples from 27 patients were evaluated, of which 12 were included in the migraine group, including 9 women. CGRP levels in women with migraine and in the control group were 0.09 ± 0.3 versus 0.10 ± 0.02 pg/ml, and in men 0.09 ± 0.01 versus 0.08 ± 0.01 pg/ml. The oxytocin concentration in the migraine group was 0.41 ± 0.33 versus 0.42 ± 0.21 pg/ml in the female group and 0.24 ± 0.12 versus 0.33 ± 0.21 pg/ml in the male group. Nitric oxide in the group of women with migraine had a mean of 20.37 ± 19.2 versus 13.08 ± 7.92 pg/ml, in men, the mean was 11.67 ± 2.10 versus 11.47 ± 6.78 pg/ml. No statistical differences were found between the concentrations of substances and the groups evaluated. Although no statistically significant differences were demonstrated between the compared groups, this study was the first to correlate the levels of substances involved in modulating CSF pain in patients with migraine.

Keywords: Migraine. CSF. Oxytocin. CGRP. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura de aminoácidos do α CGRP humano	21
Figura 2 –	Os alvos (anticorpo anti-CGRP e anticorpo anti-receptor de CGRP) para terapias de migrânea relacionadas ao CGRP ilustrados em uma varicosidade do nervo trigêmeo que inerva células do músculo liso cerebrovascular	24
Figura 3 –	Estrutura de aminoácidos da ocitocina	27
Figura 4 –	Fluxograma da estratégia de busca de artigos	33
Figura 5 –	Representação gráfica dos níveis de CGRP, OT e ON nos grupos controle e migrânea	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valor de p entre os grupos migrânea e controle relacionado aos níveis de neurotransmissores	34
Tabela 2 –	Biomarcadores identificados no LCR de pacientes com migrânea	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CALCA	Polipeptídeo α relacionado à calcitonina
CALCB	Polipeptídeo β relacionado à calcitonina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLR	Receptor tipo calcitonina
CT	Calcitonina
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Elisa	Ensaio Imunoabsorvente Enzimático
HCl	Gás cloreto de hidrogênio
I125	Iodo 125
ICHD-3	<i>International Classification of Headache Disorders, Third Edition</i>
IgG	Imunoglobulina G
LCR	Líquido cefalorraquidiano
Lika	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
ON	Óxido nítrico
PACAP38	Peptídeo ativador da adenilato ciclase hipofisária
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Sistema trigeminovascular	20
2.2	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina	20
2.2.1	Distribuição do CGRP	21
2.2.2	Liberação do CGRP.....	23
2.2.3	Receptores do CGRP	23
2.2.4	CGRP como alvo de novos tratamentos para migrânea	25
2.3	Óxido nítrico	26
2.4	Ocitocina	26
2.5	Diagnóstico e tratamento	28
2.6	Líquido cefalorraquidiano	29
3	METODOLOGIA	30
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE A – Quadro com dados gerais dos pacientes.....	55
	APÊNDICE B – Artigo aceito para publicação	57
	APÊNDICE C – Artigos publicados no período do doutorado.....	59
	APÊNDICE D – Artigo a ser submetido para publicação.....	62
	ANEXO A – Parecer de aprovação do comitê de ética.....	88

1 Introdução

A migrânea é a doença neurológica mais prevalente no mundo (DIENER, 2019). Considerada a segunda maior causa de incapacidade global, todavia é a primeira entre as mulheres (KRAUSE et al., 2021). É uma doença neurológica complexa caracterizada por crises que duram entre 4 horas e 3 dias (IYENGAR et al., 2019 b). Atinge até 15% da população adulta na maioria dos países, com predominância quase três vezes maior no sexo feminino (EDVINSSON, 2019; MAY; SCHULTE, 2016; ROHMANN et al., 2020). Com quadro neurológico de moderado à grave, incapacitante e recebendo pouca atenção, a migrânea é uma doença com grande influência danosa na vida de um paciente (MAY; SCHULTE, 2016). Com base no *Global Burden of Diseases*, a migrânea está entre os distúrbios mais prevalentes no mundo (STOVNER et al., 2018).

A migrânea envolve um quadro paroxístico de dor de cabeça de intensidade moderada à grave, cefaleia unilateral, podendo ser acompanhada por sintomas associados, como fotofobia, fonofobia, osmofobia, alodinia, náuseas e vômitos (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2013). Outros sintomas como cansaço, irritabilidade, concentração reduzida e bocejo também podem preceder a dor de cabeça (GOADSBY et al., 2017a).

A migrânea foi classicamente dividida em quatro fases: a fase premonitória, aura, dor de cabeça e pós-drome. As fases podem ocorrer em uma ordem sequencial linear, mas na maioria dos casos as fases da migrânea mostram uma sobreposição significativa, de modo que a ordem linear é quase inexistente (DODICK, 2018; GOADSBY et al., 2017a).

Embora ainda seja muito debatida, atualmente considera-se que a disfunção do sistema nervoso central desempenha um papel central na gênese da migrânea, mas o sistema trigeminal desempenha uma função importante com expressão de sintomas periféricos vinculados a fisiopatologia da migrânea (EDVINSSON, 2019). O sistema trigeminal está envolvido nos episódios dolorosos da migrânea, em decorrência da liberação do CGRP (GOADSBY; EDVINSSON, 1993; GOADSBY; EDVINSSON; EKMAN, 1990). O CGRP é um potente vasodilatador das artérias e arteríolas cerebrais, através da ativação da proteína transmembrana adenilato ciclase nas células do músculo liso dos vasos sanguíneos (EDVINSSON, 1985). A ativação de algumas estruturas da periferia, particularmente a dura-máter, com estimulação mecânica, química ou elétrica pode resultar em dor de cabeça, além de outros sintomas associados à migrânea, incluindo náusea, fonofobia e fotofobia (GOADSBY et al., 2017a),

sugerindo que crises de migrânea podem ser precipitadas na periferia, longe do sistema nervoso central.

Além do CGRP, outros peptídeos são colocalizados em neurônios do gânglio trigeminal, como a substância P, neurocinina A, PACAP, entre outros (EDVINSSON; UDDMAN, 2005). Por outro lado, há evidências de outros peptídeos, como a ocitocina que induz analgesia e pode ter um papel potencial no tratamento de distúrbios de dor de cabeça (TZABAZIS et al., 2016).

Objetivos

Objetivo geral

Analisar as concentrações de CGRP, ocitocina e óxido nítrico no líquido cefalorraquidiano de pacientes com migrânea, em comparação com um grupo controle.

Objetivos específicos

- Correlacionar os níveis de CGRP, ocitocina e óxido nítrico no LCR de pacientes com migrânea e pacientes sem migrânea;
- Comparar se há diferenças entre os níveis de CGRP, ocitocina e óxido nítrico no LCR entre os sexos.

Hipótese

Há diferença nas concentrações de CGRP, ocitocina e óxido nítrico no líquido cefalorraquidiano entre pessoas com migrânea e sem migrânea.

2 Revisão de literatura

O debate sobre a fisiopatologia da migrânea tem centrado amplamente nos mecanismos neurais ou vasculares que podem estar envolvidos no desencadeamento de uma crise (GOADSBY et al., 2017a). Historicamente, quase 150 anos atrás, a migrânea foi considerada um distúrbio do cérebro por Edward Liveing, ao mesmo tempo Peter Wallwork Latham descreveu a provável origem da migrânea vinculada com vasodilatação, com alguma relação com a aura migranosa (GOADSBY et al., 2017a; WEATHERALL, 2012).

O *Global Burden of Disease* identifica a migrânea como uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo (STOVNER et al., 2018). Há também os distúrbios comórbidos associados à migrânea, incluindo dor no pescoço, depressão e ansiedade, além da migrânea estar entre as dez principais causas de incapacidade em todo o mundo, a primeira entre as mulheres abaixo dos 50 anos (CHARLES, 2018; STOVNER et al., 2018). Além dos fatores incapacitantes, o custo financeiro da migrânea é uma outra preocupação da sociedade, com gastos sanitários anuais estimados em mais de US\$ 20 bilhões (DODICK, 2018).

A migrânea é caracterizada como um distúrbio neurológico crônico, representado por crises de dor de cabeça moderada ou grave, sintomas neurológicos e sistêmicos reversíveis (TEPPER, 2018). Os sintomas mais comuns associados à migrânea incluem fotofobia, fonofobia, alodinia cutânea e térmica e sintomas gastrointestinais como náusea e êmese (DODICK, 2018; TEPPER, 2018). A dor de cabeça da migrânea costuma ser relatada pelos pacientes como unilateral (60%), pulsátil (50%) e agravada pela atividade física ou pelo movimento da cabeça (90%) (DODICK, 2018).

O tratamento da migrânea inclui o uso de terapia medicamentosa e técnicas comportamentais. Vários princípios gerais melhoram os resultados do tratamento agudo, incluindo a administração precoce de medicação enquanto a dor é leve e a escolha da dose e via de administração corretas (DODICK, 2018).

A migrânea tem uma forte influência genética, mas sua fisiopatologia é em grande parte desconhecida (NYHOLT; VAN DEN MAAGDENBERG, 2016). O diagnóstico é baseado na história do paciente e na avaliação clínica. Embora muito comum, existem muitas lacunas no conhecimento sobre as vias de sinalização envolvidas e faltam biomarcadores específicos para migrânea (ASHINA et al., 2017).

A migrânea, a depressão e a epilepsia são condições comórbidas, em que a presença de uma dessas doenças aumenta o risco de desenvolvimento de uma ou de ambas as outras e vice-versa (STAM et al., 2010). Os distúrbios também compartilham consonância nos tratamentos, o que sugere mecanismos comuns (FERRARI et al., 2015). Os pacientes com migrânea também apresentam maior risco de acidente vascular encefálico e doença coronariana, indicando envolvimento sistêmico da vasculatura na migrânea (FERRARI et al., 2015).

2.1 Sistema trigeminovascular

Apesar do cérebro ser conhecido como uma estrutura insensível em relação ao desencadeamento de dor após um estímulo mecânico ou químico, há um rico plexo de fibras nervosas nociceptivas que se originam na periferia do gânglio trigeminal e inervam as artérias cerebrais de grosso calibre da base do crânio, artérias meníngeas e, além disso, se projetam em partes da dura-máter que não são altamente vascularizadas (GOADSBY et al., 2017a; IYENGAR et al., 2019a).

A migrânea envolve a ativação do sistema trigeminovascular pela liberação do CGRP (EDVINSSON, 2019; WATTIEZ; WANG; RUSSO, 2019). Os vasos meníngeos são ricamente inervados com fibras C nociceptivas aferentes primárias não mielinizadas e fibras A δ finamente mielinizadas, originando-se principalmente da divisão oftálmica do nervo trigeminal (IYENGAR et al., 2019a). Estudos imunohistoquímicos com meninges humana e de rato, revelaram que as fibras C amielínicas, que inervam as artérias meníngeas e cerebrais, expressam CGRP, bem como substância P, VIP e nNOS. Assim, o CGRP liberado dos terminais das fibras C pode sensibilizar os terminais nervosos A δ adjacentes (CERNUDA-MOROLLON et al., 2013).

2.2 Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

O CGRP é uma biomolécula cuja forma α é composta por 37 aminoácidos (Figura 1). Duas isoformas de CGRP tenham sido identificadas (α - e β -CGRP), que em humanos diferem apenas em três aminoácidos, mas apesar de estruturas pouco diferentes compartilham atividades semelhantes (EDVINSSON et al., 2018; HAY; WALKER, 2017; RUJAN; REYNOLDS, 2019; VONGVAIVANICH et al., 2015). A forma predominante α -CGRP (Figura 1) é o resultado do

EVANS§, 1983; ROSENFELD; AMARA; EVANS, 1984). Inicialmente, a isoforma β -CGRP foi descrita como sendo sete vezes mais expressa no intestino em relação ao α -CGRP, no entanto, outros achados sugerem que β -CGRP é mais comumente observado na mucosa e na túnica adventícia das artérias mesentéricas e no plexo mioentérico de ratos (SOMASUNDARAM et al., 2006).

O CGRP é um neuropeptídeo com ação sensorial com potentes efeitos cardiovasculares (SOMASUNDARAM et al., 2006). No entanto, a distribuição do CGRP no sistema vascular é muito escassa, ao contrário do sistema nervoso central e periférico, sendo as fibras sensoriais A e C um dos locais predominantes de liberação (MAGGI, 1995). Essa molécula tem uma grande interação com a maioria das síndromes de dor do corpo. Um dos locais onde ocorre a liberação do CGRP é no gânglio trigeminal. Essa liberação está amplamente envolvida em crises dolorosas de dor de cabeça e migrânea (EDVINSSON, 2019) (Figura 2). Até o momento, estudos demonstraram que o CGRP está diretamente ligado às crises de migrânea, mas outros mensageiros neuronais também podem estar envolvidos. Descobertas recentes fornecem uma nova visão sobre o papel complexo do sistema nervoso central e do sistema trigeminal na fisiopatologia da migrânea (EDVINSSON et al., 2018). No entanto, embora estudos anteriores já tenham abordado o papel do CGRP, algumas de suas funções permanecem incertas (RUSSELL et al., 2014).

2.2.2 Liberação do CGRP

Como mencionado anteriormente, a liberação de CGRP associada ao sistema trigeminovascular é responsável por disfunções em regiões do sistema nervoso central, levando a crises de migrânea. Essas alterações podem incluir regiões do córtex e do tronco cerebral (CHARLES, 2018; DODICK, 2018; EDVINSSON, 2019; MAY, 2017).

Há estudos que mostram que a estimulação meníngea por meio de compostos inflamatórios ou estimulação elétrica resulta na ativação de aferentes craniovasculares e, consequentemente, na liberação de peptídeos vasodilatadores (WATTIEZ; WANG; RUSSO, 2019). Com a estimulação elétrica da superfície dural, há depleção de fibras imunopositivas para CGRP, sugerindo liberação de CGRP e aumento do fluxo sanguíneo dural ao redor dos ramos da artéria meníngea média (MESSLINGER et al., 1995). Como resultado, é possível observar que a estimulação dos aferentes trigeminais que inervam a dura-máter induz a

liberação de CGRP dos terminais aferentes peptidérgicos, que por sua vez causam vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo meníngeo (WATTIEZ; WANG; RUSSO, 2019).

Há evidência de que o CGRP pode ser liberado juntamente com o PACAP38, glutamato e óxido nítrico, através da transmissão sensorial de sinais nociceptivos de aferentes sensoriais trigêmeos periféricos para neurônios de segunda ordem (DODICK, 2018; GOADSBY et al., 2017a). Devido à ativação do sistema trigeminovascular durante as crises de migrânea, o gânglio trigeminal é o centro de interesse para o estudo da expressão do CGRP e seus receptores (EFTEKHARI et al., 2013; LIU; BROMAN; EDVINSSON, 2008). Como consequência da liberação de CGRP e PACAP38 ocorre dilatação dos vasos cranianos e degranulação dos mastócitos, o que pode resultar na ativação de nociceptores vasculares e meníngeos, contribuindo para deflagração de uma crise de migrânea (DODICK, 2018; NOSEDA; BURSTEIN, 2013).

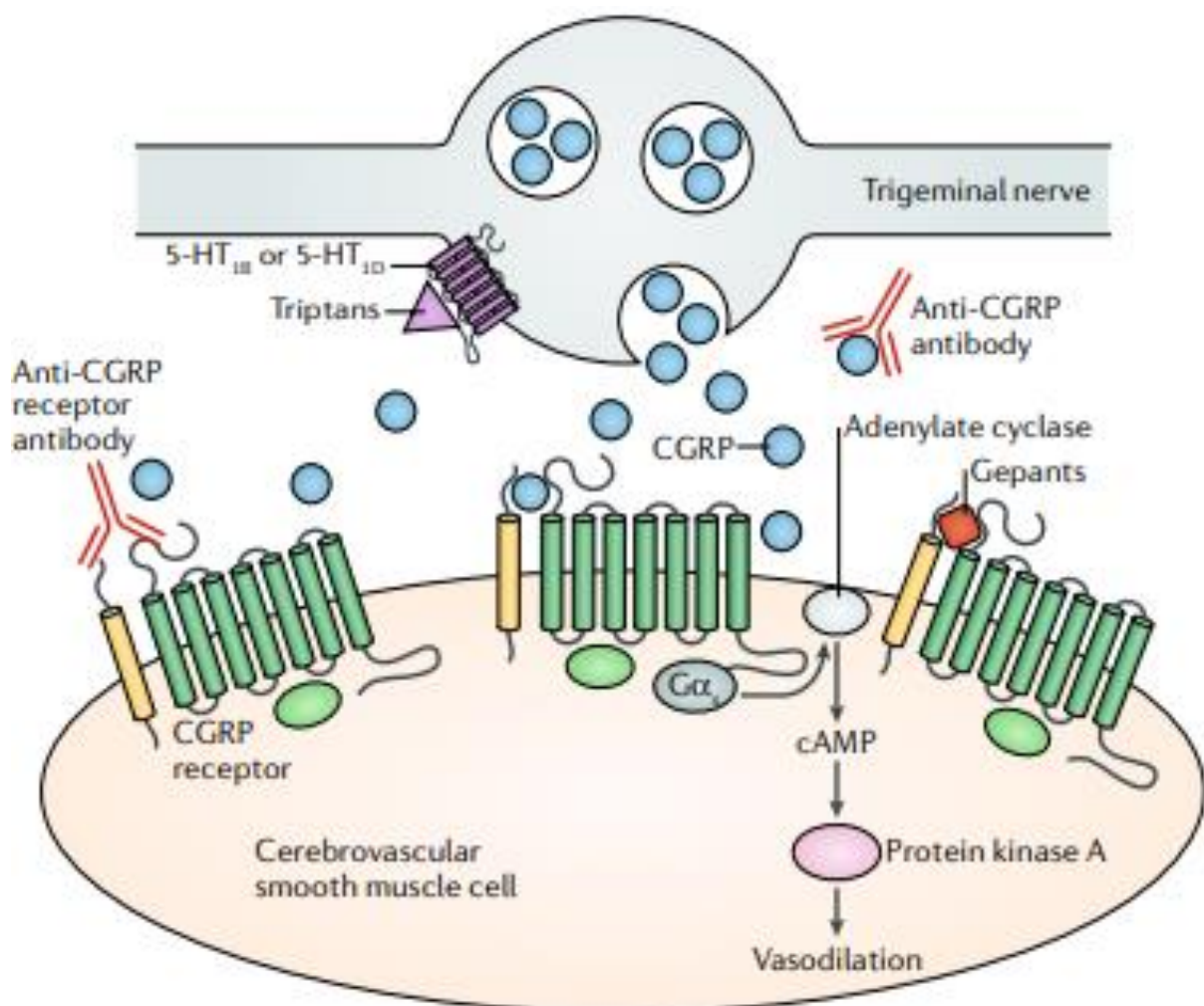
2.2.3 Receptores do CGRP

Historicamente, considerava-se que existiam duas classes de receptores de CGRP, CGRP1 e CGRP2, no entanto, sabe-se que CGRP1 é o único receptor de CGRP (DEBBIE L. HAY, DAVID R. POYNER, 2008; NOSEDA; BURSTEIN, 2013). O receptor CGRP é composto pelo CLR, um CGRP classe B e uma proteína transmembrana de passagem única conhecida como proteína modificadora do receptor tipo 1 (RAMP1) (RUJAN; REYNOLDS, 2019).

Em conjunto com outros receptores acoplados à proteína G, o receptor CGRP pode desencadear várias vias de sinalização e sofrer controle regulatório (EDVINSSON, 2019; HAY et al., 2018). O CLR é um membro da família de receptores de secretina e é um elemento essencial para os receptores de CGRP e adrenomedulina (AM1 e AM2). Para criar um receptor de membrana funcional com afinidade específica para o CGRP, o CLR deve formar um heterodímero com RAMP1. As proteínas RAMP alteram a farmacologia, a funcionalidade e o tráfego celular de peptídeos estimuladores de receptores de calcitonina específicos. O domínio de ligação do ligante do receptor CGRP está localizado na interface entre as proteínas RAMP1 e CLR. Assim, para uma célula responder ao CGRP, é necessária a co-expressão de CLR e RAMP (HAY et al., 2018; MALLEE et al., 2002).

A co-expressão de CLR com as proteínas RAMP2 e RAMP3 fornecem receptores que se ligam preferencialmente ao AM (MCLATCHIE et al., 1998). Esses são os receptores AM1 e AM2 (POYNER, DAVID; SEXTON, PATRICK; MARSHALL, IAN; SMITH, DAVID; QUIRION; REMI; BORN, WALTER; MUFF, 2002). O receptor AM2, em particular, tem afinidade significativa pelo CGRP e, portanto, pode ser ativado por esse peptídeo em altas concentrações farmacológicas (DEBBIE L. HAY, DAVID R. POYNER, 2008; HAY; WALKER, 2017).

Figura 2 – Os alvos (anticorpo anti-CGRP e anticorpo anti-receptor de CGRP) para terapias de migrânea relacionadas ao CGRP ilustrados em uma varicosidade do nervo trigeminal que inerva células do músculo liso cerebrovascular



Fonte: EDVINSSON et al. (2018).

2.2.4 CGRP como alvo de novos tratamentos para migrânea

Estudos experimentais e clínicos demonstraram que vários antagonistas de pequenas moléculas oportunizam o bloqueio potente e seletivo as respostas de CGRP (Figura 2) (EDVINSSON, 2007, 2015). Essas moléculas são chamadas de gepants e, embora não sejam quimicamente relacionadas entre si, elas têm um modo de ação compartilhado (EDVINSSON et al., 2018). Olcegepant foi o primeiro antagonista não peptídico do receptor CGRP a ser descoberto, em células e em preparações de tecidos, bloqueou potentemente a ligação do CGRP ao seu receptor (DOODS et al., 2000; EDVINSSON et al., 2002). Olcegepant também bloqueou as respostas de CGRP *in vivo* em ratos e, conseqüentemente, foi modulado para testes intravenosos em humanos (OLESEN et al., 2004; PETERSEN et al., 2005). Outros gepants foram desenvolvidos subsequentemente exibindo maior eficácia e boa biodisponibilidade oral. Contudo, o desenvolvimento clínico de vários gepants foi interrompido devido ao risco de toxicidade hepática com o uso a longo prazo (EDVINSSON; LINDE, 2010; HO et al., 2008).

Logo após a descoberta do CGRP, em 1982 (AMARA et al., 1982), os primeiros anticorpos contra o peptídeo foram produzidos. Esses anticorpos específicos são usados para inibir a ação do CGRP (Figura 2), como por exemplo, galcanezumab, eptinezumab e fremanezumab, e demonstram ser eficazes na prevenção da migrânea episódica e crônica (PULEDDA; MESSINA; GOADSBY, 2017; SILBERSTEIN et al., 2017).

Uma outra alternativa foi o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal contra o receptor CGRP (Figura 2), uma nova abordagem terapêutica que bloqueia o receptor CGRP. Erenumab (AMG334) é um anticorpo monoclonal humano que foi criado contra uma proteína de fusão dos domínios extracelulares de CALCRL e RAMP1 em humanos (SHI et al., 2016). Esse anticorpo é 5.000 vezes mais seletivo para o receptor de CGRP humano do que para outros receptores relacionados à família de receptores de calcitonina (GOADSBY et al., 2017b). Erenumab liga-se aos receptores de CGRP humanos com alta afinidade e antagoniza totalmente as respostas de CGRP *in vitro* e *in vivo* (SHI et al., 2016). Ensaios clínicos mostraram que o erenumab é uma terapia profilática eficaz para migrânea episódica e crônica (EDVINSSON, 2015; SCHUSTER; RAPOPORT, 2016).

2.3 Óxido nítrico

O ON é uma pequena molécula lipofílica, que no vaso é liberada a partir de células endoteliais e utiliza a L-arginina para realizar sua síntese (ASHINA et al., 2017). Nas células do endotélio vascular, com a presença do oxigênio molecular, o terminal guanídino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, com isso, o ON e a L-citrulina são produzidos em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). O ON atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel, e como consequência tem-se a formação de cGMP intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (KUO; SCHROEDER, 1995; LOWENSTEIN; SNYDER, 1992).

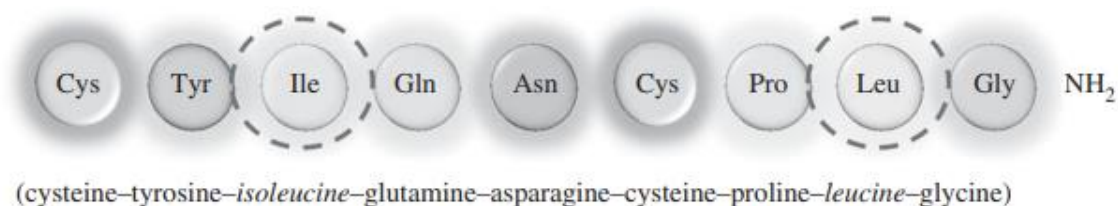
Quando a concentração do cGMP está alta, o cálcio intracelular aumenta, relaxando as células musculares e uma vasodilatação acontece. Enquanto a difusão do ON para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo, a vasodilatação se mantém. À medida que aumenta o fluxo de ON para a musculatura lisa vascular, maior o relaxamento celular e consequentemente vasodilatação (HO; EDVINSSON; GOADSBY, 2010). O oposto só acontece quando a síntese de ON diminui.

Altas concentrações de ON estimulam a liberação de CGRP e, assim, ativam o sistema trigeminovascular (GROSS et al., 2019; KEE; KODJI; BRAIN, 2018). Acredita-se que várias vias estejam envolvidas no vasorrelaxamento dependente de CGRP, incluindo vias dependentes e independentes do endotélio. A via independente do endotélio e do ON é a mais comumente observada (RUSSELL et al., 2014).

2.4 Ocitocina

Apesar de composta por apenas nove aminoácidos (Figura 3) (MAHAJAN et al., 2022), a OT é um neuropeptídeo complexo capaz de influenciar vários comportamentos, dentre eles, comportamentos sociais, reprodutivos, maternos, afiliativos e sexuais (GOODIN; NESS; ROBBINS, 2015; LOVE, 2014). Polipeptídeos, como a OT, são polímeros orgânicos e lineares. Os polímeros são moléculas altamente seletivas que como neurotransmissores ou moduladores ativam receptores do sistema nervoso, incluindo aqueles associados à dor e analgesia, e, portanto, têm um grande potencial terapêutico na dor (BHARADWAJ et al., 2021).

Figura 3 – Estrutura de aminoácidos da ocitocina



Fonte: BERNTSON et al. (2012).

A OT plasmática não atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, não havendo relação entre a liberação de OT no sangue pela neuro-hipófise e as variações nas concentrações de OT no LCR. A OT no LCR é provavelmente derivada de neurônios que se estendem para o terceiro ventrículo, sistema límbico, tronco encefálico e medula espinal. No LCR, a OT está normalmente presente em concentrações de 10 –50 pg/ml, e sua meia-vida é em torno de 28 minutos, enquanto no sangue é de 1 a 2 minutos (JONES; ROBINSON, 1982; MEYER et al., 1987).

Neurônios em várias regiões do encéfalo e da medula espinal possuem receptores de OT, incluindo neurônios da raiz dorsal da medula espinal (UNGER; LANGE, 1991), dos gânglios trigeminais (VECSERNYÉS et al., 1987) e dos terminais de neurônios hipotalâmicos (SWANSON; MCKELLAR, 1979; TZABAZIS et al., 2016). A presença de receptores de OT na raiz dorsal e nos neurônios dos gânglios trigeminais sugere um efeito analgésico da ocitocina (TZABAZIS et al., 2017a).

Além do envolvimento na contração uterina (ROSENBLUM, IRA; STEIN, 1964), lactação (NICKERSON et al., 1954) e processos psicossociais (CARTER et al., 1992), a OT endógena está certamente envolvida no mecanismo de analgesia (TZABAZIS et al., 2016).

Apesar dos nervos sensoriais trigeminais nociceptivos estarem envolvidos na mediação da neurotransmissão excitatória através do complexo trigeminocervical durante a migrânea, a OT inibe a transmissão nociceptiva neste nível, podendo ser considerada como potenciais agentes anti-migranosos (AKERMAN; HOLLAND; HOFFMANN, 2013).

Estudos recentes mostram que a OT desempenha um papel analgésico na migrânea (BHARADWAJ et al., 2021). Um modelo eletrofisiológico de migrânea demonstrou que a OT reduz o impacto neuronal do complexo trigeminocervical, acionado pela estimulação elétrica meníngea (GARCÍA-BOLL et al., 2020).

Contudo, há uma dificuldade na entrega de peptídeos ao cérebro, devido a uma limitação gerada pela barreira hematoencefálica, que inibe a entrada da maioria dos peptídeos terapêuticos que chegam através da corrente sanguínea (BHARADWAJ et al., 2021).

Embora os estudos acima tenham identificado a OT em vários tecidos, é importante investigar a presença da OT em outros locais, como no LCR, visto que esse tem íntimo contato com todo o sistema nervoso central, havendo trocas de substâncias entre esses dois compartimentos.

2.5 Diagnóstico e tratamento

A migrânea manifesta-se clinicamente com crises recorrentes de cefaleia e uma série de sintomas concomitantes (EIGENBRODT et al., 2021). Uma vez diagnosticada a migrânea, encontrar um tratamento adequado e benéfico é um desafio. É importante estabelecer um controle rigoroso dos fatores predisponentes, dos quais um dos principais é o uso excessivo de medicação aguda (MAY; SCHULTE, 2016).

Os tratamentos para migrânea incluem medicamentos para debelar ou atenuar uma crise aguda e ou fármacos com ação preventiva, e algumas terapias não farmacológicas (ASHINA et al., 2021a). Apesar das opções de tratamento e dos critérios de diagnósticos abrangentes, o atendimento clínico continua inferior ao ideal, levando a um subtratamento do paciente com migrânea, o que gera um desafio de saúde pública (ASHINA et al., 2021b; KATSARAVA et al., 2018).

Através do uso da OT intranasal, foi demonstrada uma diminuição da frequência de dores de cabeça em migrânea crônica e migrânea episódica de alta frequência (BHARADWAJ et al., 2021; TZABAZIS et al., 2017b). Uma outra estratégia para tratamento da migrânea se dá através dos anticorpos monoclonais anti-CGRP, uma alternativa eficaz para o alívio da migrânea. O medicamento foi o primeiro a ser desenvolvido com o objetivo de prevenir as crises de migrânea, seguindo pistas bioquímicas ao se avaliar a fisiopatologia da migrânea (EDVINSSON; GOADSBY, 2019).

As drogas anti-CGRP são pequenas moléculas antagonistas que têm demonstrado bloquear de forma potente e seletiva as respostas do CGRP, como evidenciado em estudos experimentais e clínicos (EDVINSSON, 2007, 2015).

2.6 Líquido cefalorraquidiano

O cérebro é o único em relação a outros órgãos em que a superfície externa e estruturas que circundam os ventrículos cerebrais são banhadas por um compartimento fluido, o LCR, além de ter em sua superfície interna a barreira hematoencefálica e a barreira hemato-liquórica, que limitam passagem de substâncias do sangue para o sistema nervoso central ou LCR, respectivamente. O LCR é produzido em grande parte pelos plexos coróides, que revestem as cavidades dos quatro ventrículos encefálicos (PARDRIDGE, 2016). Estima-se que o volume de LCR circulando é em torno de 150 ml em adultos, distribuídos entre 125 ml nos espaços subaracnóides cranianos e espinais e 25 ml nos ventrículos (SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011).

O LCR não é simplesmente um ultrafiltrado plasmático, há a presença do Na^+ , Cl^- e Mg^{2+} , que têm concentrações maiores do que as do plasma, e de K^+ e Ca^{2+} com concentrações menores. A contagem de células do LCR, em condições normais, geralmente não excede cinco células por mililitro. Variações na composição do LCR podem ser usadas para fins de diagnóstico (SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011). Uma relação entre a concentração de Na^+ e a migrânea foi proposta, sugerindo que os picos de Na^+ correspondem ao momento da crise de migrânea (HARRINGTON et al., 2010). Alguns estudos relataram alterações de alguns biomarcadores no LCR de pacientes com migrânea (Tabela 1). É importante reconhecer se há alterações em outras moléculas no LCR capazes de ter efeito fisiológico na crise de migrânea.

3 Metodologia

3.1 Seleção dos participantes

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco através do protocolo CAAE 99301018.0.0000.5208. Todos os participantes foram informados de todos os procedimentos relacionados ao estudo, aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), autorizando a participação.

Para selecionar e classificar os pacientes atendidos no HC/UFPE dentro do grupo migrânea (com ou sem aura) ou controle, foram utilizados os critérios baseados na “*The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition, 2018*” (OLESEN, 2018), que traz os seguintes critérios de diagnóstico:

- A. Pelo menos cinco episódios preenchendo os critérios de B a D.
- B. Episódios de cefaleia com 4 a 72 horas (não tratada ou tratada sem sucesso).
- C. A cefaleia tem, pelo menos duas, das quatro características seguintes:
 - 1. Localização unilateral
 - 2. Pulsátil
 - 3. Dor moderada ou grave
 - 4. Agravamento por atividade física de rotina ou seu evitamento (por exemplo, caminhar ou subir escadas)
- D. Durante a cefaleia, pelo menos, um dos seguintes:
 - 1. Náuseas e/ou vômitos
 - 2. Fotofobia e fonofobia

Todos os pacientes ou seus representantes legais, foram informados sobre todo o procedimento da pesquisa que foi realizada em três etapas principais:

- Primeira etapa (avaliação clínica): Coleta de dados pessoais (nome, idade e telefone);
- Segunda etapa (coleta de material): Foi coletado 1ml de LCR através da punção lombar durante a raquianestesia;
- Terceira etapa (análise molecular): análise da concentração das substâncias presentes no LCR.

3.2 Coleta e armazenamento das amostras

A coleta de LCR foi realizada pelo médico anestesistas no momento da raquianestesia, pelo método de aspiração. O material foi acondicionado em tubos Eppendorf de 2,0 ml, congelados logo após a coleta a -80°C, recebendo como identificação a mesma numeração atribuída ao questionário.

3.3 Análise de LCR

A análise laboratorial foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.3.1 Concentrações de ocitocina

As dosagens de OT foram realizadas em 27 amostras através de radioimunoensaio específicos em duplicata. Nos ensaios foram utilizados antissoros de coelho (antiOT), peptídeo padrão para a marcação iodo-125 e anti-soro de cabra anti-IgG de coelho. Para a determinação das concentrações de OT utilizaram-se os tampões Na₂HPO₄ (0,062M) e Na₂-EDTA (0,013 M) com 0,5% BSA em pH 7,5 e o peptídeo marcado com iodo-125 foi de fonte comercial (DupontCo., Boston, MA, USA). A dose mínima para detecção foi de 0,04 pg/ml.

3.3.2 Concentrações de óxido nítrico

As concentrações do óxido ON foram mensuradas em 25 amostras de LCR pela quantidade de nitrato, obtida pela técnica de quimiluminescência NO/ozônio. Os procedimentos foram realizados utilizando-se 20 µL de LCR, os quais foram desproteinizados por incubação com 40 µL de etanol 95% a 4°C por 30 minutos e, centrifugados por 5 minutos a 5.000 g. Amostras do sobrenadante (10 µL) foram injetadas em um vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N a 95°C) que converte o nitrato em ON, em quantidades equimolares. O ON é aspirado, usando o gás hélio para a câmara de quimiluminescência do aparelho Sievers NO Analysis (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA). A detecção do ON decorre de sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha. O fóton emitido é detectado e convertido em sinal elétrico.

3.3.3 Concentrações de CGRP

Utilizando-se o ensaio imunoenzimático, o CGRP foi detectado e quantificado em 22 amostras. Para a detecção do CGRP, foi utilizado o kit CGRP (rat) ELISA kit (Bertin Pharma,

França), que reconhece igualmente CGRP humano (especificidade CGRP Humano- α/β : 100%). Como o CGRP, possivelmente, estava presente na amostra em baixa concentração, não foi realizada a diluição do tampão (como sugere o manual). Cada poço da placa foi enxaguado 5 vezes com o tampão de lavagem (300 μ L/poço). Pouco antes de distribuir os reagentes e as amostras, o tampão foi removido dos poços invertendo a placa e balançando as últimas gotas em uma toalha de papel. Na pipetagem dos reagentes, foi dispensado 100 μ L de NBS em três poços; foi pipetado 100 μ L do CGRP padrão em diferentes concentrações em oito poços; foi dispensado 100 μ L da amostra nos poços; foi pipetado 100 μ L do marcador em cada poço, exceto onde estava o blank. Em seguida, a placa foi incubada a -4°C por 20 horas. Após o término do tempo estabelecido, a placa foi esvaziada e os poços foram lavados cinco vezes com 300 μ L do tampão de lavagem. Ao final das lavagens, foi adicionado 200 μ L de Ellman's Reagent em cada um dos 96 poços. A placa foi lida no equipamento leitor de microplaca multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) em comprimento de onda entre 405 e 414 nm.

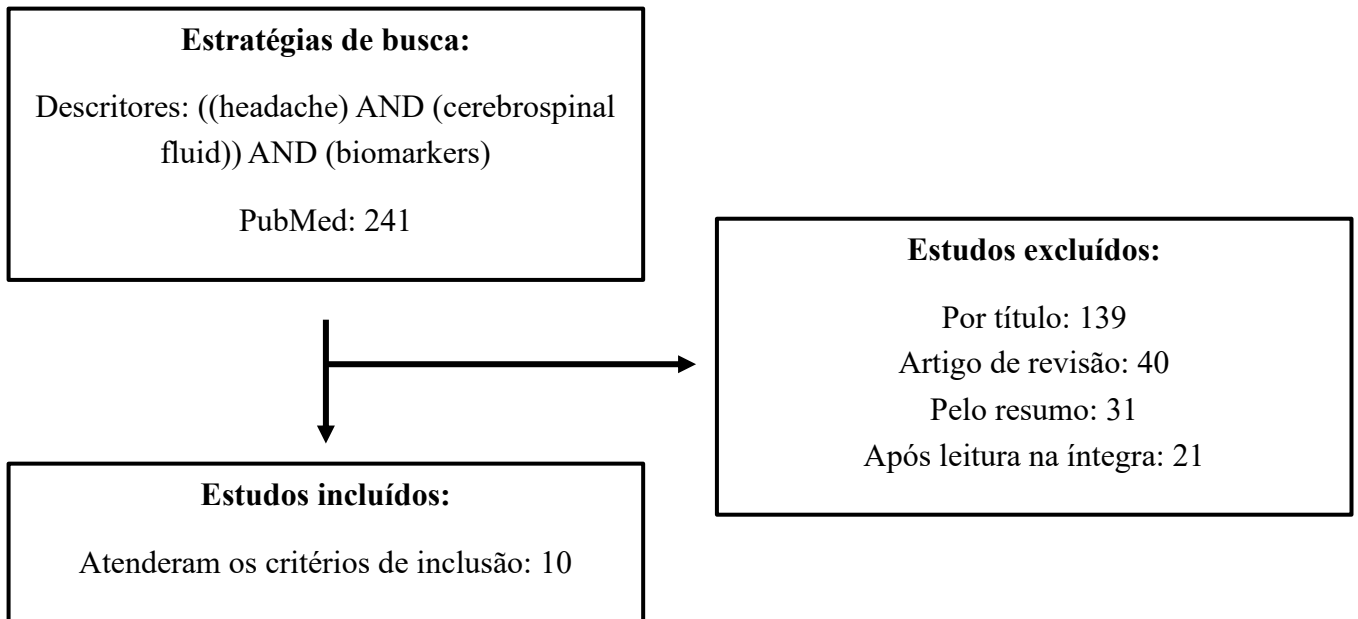
3.4 Análise estatística

Utilizamos o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar o tipo de distribuição das variáveis estudadas. Quando as variáveis apresentavam uma distribuição normal, utilizamos os testes paramétricos (teste t de Student), no caso contrário, foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney para comparações entre dois grupos. O nível de significância considerado como diferente estatisticamente foi de $p < 0,05$.

3.5 Construção de tabela de revisão da literatura

Para realizar a busca na literatura dos artigos que abordaram as biomoléculas identificadas no LCR de indivíduos com migrânea, foi realizada a estratégia de busca conforme a figura 4.

Figura 4: Fluxograma da estratégia de busca de artigos



4 Resultados

Cinquenta e um pacientes passaram pela triagem, dos quais, 27 passaram pela coleta do LCR (14 mulheres, com idade de $48,2 \pm 14,12$ anos, homens $42,77 \pm 15,71$) que foram submetidos a cirurgias eletivas no Hospital das Clínicas da UFPE, Recife, Brasil. Seguindo os critérios da ICHD-3, a migrânea foi diagnosticada em 12 pacientes (idade $47,8 \pm 11,1$ anos), sendo 3 homens (idade $50,7 \pm 6,5$ anos) e 9 mulheres (idade $46,9 \pm 12,4$ anos).

A concentração do CGRP foi de $0,09 \pm 0,03$ pg/ml em mulheres com migrânea, e nos homens $0,09 \pm 0,00$ pg/ml ($p=0,824$). Nas mulheres do grupo controle o valor foi de $0,10 \pm 0,02$ pg/ml e nos homens $0,08 \pm 0,01$ pg/ml, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p=0,102$).

Nas mulheres com migrânea a concentração da OT no LCR foi de $0,41 \pm 0,33$ pg/ml, enquanto que nos homens foi de $0,24 \pm 0,12$ pg/ml ($p=0,281$). No grupo controle sem migrânea a concentração do OT no LCR foi de $0,42 \pm 0,21$ pg/ml nas mulheres e de $0,33 \pm 0,21$ pg/ml nos homens ($p=0,112$).

No grupo de mulheres com migrânea a concentração de ON no LCR foi de $20,37 \pm 19,2$ pg/ml, e nos homens a concentração foi de $11,67 \pm 2,10$ pg/ml ($p=0,471$). No grupo controle a concentração foi de $13,08 \pm 7,92$ pg/ml nas mulheres e de $11,47 \pm 6,78$ pg/ml nos homens ($p=0,686$).

Quando avaliada a concentração de CGRP no LCR verificou-se que não houve diferença estatística entre os dois grupos – controle e migrânea (Figura 5).

Na tabela 2 são demonstrados os biomarcadores encontrados no LCR de pacientes com migrânea.

Tabela 1: Valor de p entre os grupos migrânea e controle relacionado às concentrações de CGRP, ocitocina e óxido nítrico

Neurotransmissores	Grupos		
	Migrânea	Controle	Migrânea vs. Controle
	homens vs. mulheres	homens vs. mulheres	homens e mulheres
	(valor de p)	(valor de p)	(valor de p)
CGRP	0,824	0,102	0,674
Ocitocina	0,281	0,112	0,904
Óxido nítrico	0,471	0,686	0,643

Figura 5 – Representação gráfica dos níveis de CGRP, OT e ON

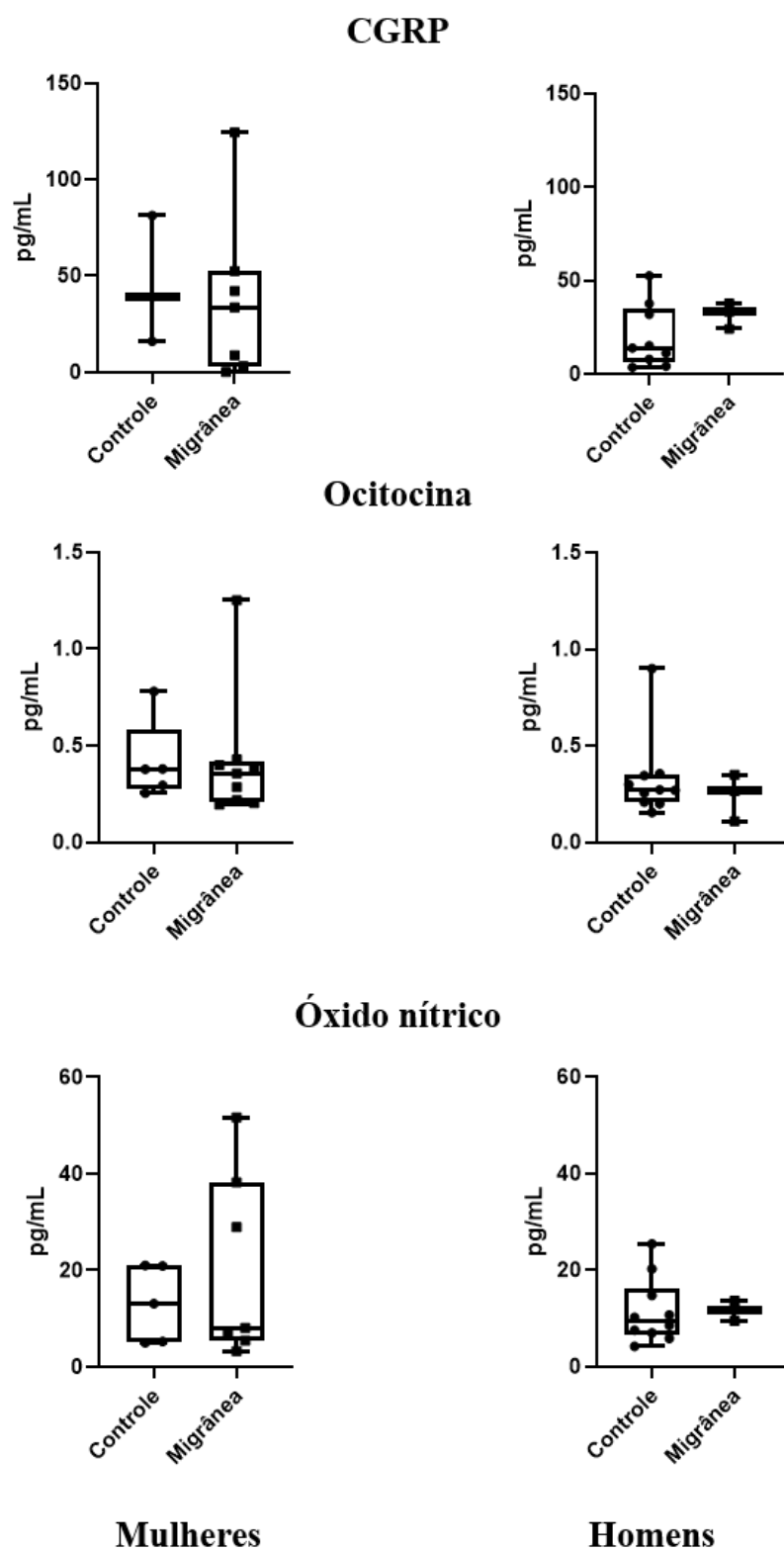


Tabela 2: Biomarcadores identificados no LCR de pacientes com migrânea

Referências	Amostras	Biomarcadores	Resultados
GALLAI et al., 2003	Quarenta e cinco pacientes: 20 controles, 10 migrânea sem uso de medicamentos e 15 migrânea com uso diário	Glutamato e ON	Os níveis de glutamato em pacientes com migrânea foi significativamente maior do que pacientes controle ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre uso ou não de analgésicos. Níveis de produtos finais de ON também foram encontrados paralelamente aumentados em comparação ao grupo controle ($p < 0,002$).
PERES et al., 2004	Quarenta pacientes: 20 pacientes com migrânea crônica e 20 indivíduos controle	Glutamato	Os níveis de glutamato em pacientes com migrânea foi significativamente maior do que pacientes controle ($p < 0,0001$). O escore médio de dor se correlacionou com os níveis de glutamato no LCR ($r = 0,551$, $p = 0,012$). Pacientes com migrânea e fibromialgia tiveram níveis mais elevados de glutamato no LCR do que pacientes sem fibromialgia ($0,34 \pm 0,27$ vs. $0,19 \pm 0,06$ mmol/l) ($p < 0,04$).

VIEIRA et al., 2007	Trinta e oito pacientes: 19 pacientes com migrânea crônica e 19 indivíduos controle	Glutamato	Os níveis de glutamato em pacientes com migrânea foi significativamente maior do que pacientes controle ($p < 0,01$). Em contraste, os pacientes que abusam dos triptanos apresentaram níveis de glutamato no LCR inferiores aos observados em pacientes com migrânea crônica não usuá-rios excessivos ($0,175 \pm 0,057$ vs $0,354 \pm 0,141 \mu\text{mol}$, $p = 0,015$), mas significativamente maior do que controles ($0,175 \pm 0,057$ vs $0,109 \pm 0,066 \mu\text{mol}$, $p = 0,039$).
HARRINGTON et al., 2006	Trinta e um pacientes: 20 pacientes com migrânea crônica sem aura e 11 indivíduos controle	Sódio	Os níveis de Na^+ no LCR foram significativamente diferentes de acordo com grupo clínico, se encontrando mais elevados nos pacientes migranosos ($p < 0,005$)
ISOBE; TERAYAMA, 2010	Noventa indivíduos: 30 com migrânea sem aura, 30 com migrânea com aura e 30 controle	Homocisteína	Não se obteve diferenças significativas na concentração de homocisteína livre entre os grupos. Entretanto, indivíduos com migrânea com e sem aura apresentaram níveis aumentados de homocisteína total ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Pacientes migrananosos com e sem aura mostraram uma diminuição significativa

			no total de metionina comparado com controles ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).
BØ et al., 2009	Trinta e quatro migrânea sem aura, 24 migrânea com aura, 39 cefaleia tipo tensional, 10 cefaleia cervicogênica, 20 controle	Citocina	As principais diferenças foram encontradas entre o grupo de pacientes controle e de pacientes com cefaleia tipo tensional e migrânea sem aura. Em ambos esses grupos de cefaleia, IL-1ra, MCP-1 e TGF-b1 estavam significativamente elevados em comparação com os níveis no grupo controle. No grupo migrânea com aura, houve diferenças significantes apenas nos níveis de IL-1ra e MCP-1.
FONTEH et al., 2011	Quarenta e sete pacientes: 30 com migrânea crônica sem aura e 17 indivíduos controle.	Fosfolipase C (PLC)	Atividade da PLC foi significativamente aumentada no grupo de pacientes que apresentaram cefaleia de gravidade >5 (numa escala de 0 a 10) em relação ao grupo controle. Também estava aumentada no grupo com ausência de cefaleia por >24 horas no período da coleta em relação à encontrada no grupo controle. E estava maior no grupo dos que apresentaram cefaleia do que no dos que não apresentaram no período da coleta.

STEINBERG et al., 2010a	Vinte e cinco indivíduos: 14 com cefaleia em salvas e 11 controles	ON	Pacientes com cefaleia em salvas no período ativo, tiveram níveis de ON aumentados (média 9,3, IC 95% 8,5–10,1) em comparação com a remissão (média 7,6, IC 95% 6,9–8,2; $p < 0,001$) e controles (média 6,2, IC 95% 4,9–7,5; $p < 0,001$). Pacientes em remissão também tiveram níveis maiores de ON do que indivíduos controle ($p = 0,034$).
WANG et al., 2013a	Cento e doze pacientes diagnosticados com migrânea ou cefaleia tipo tensional	Ocitocina	Comparando com os voluntários saudáveis, a concentração de OT no LCR aumentou significativamente em pacientes com cefaleia ($33,21 \pm 6,37$ pg/ml vs. $16,38 \pm 4,53$ pg/ml, $p < 0,01$). Foi observado um resultado positivo na relação entre a gravidade da dor de cabeça e a concentração de OT no LCR em pacientes com cefaleia ($Y = 9,898X + 7,614$, $R = 0,950$, $p < 0,001$).
SARCHIELLI et al., 2007a	Cinquenta indivíduos: 15 pacientes com provável migrânea crônica, 15 com provável cefaleia de abuso de analgésicos e 20 pacientes controle	CGRP	Pacientes com migrânea e cefaleia por abuso apresentaram níveis aumentados de CGRP no LCR em comparação ao grupo controle ($p < 0,0005$).

5 Discussão

A migrânea é caracterizada por crises recorrentes de dor de cabeça e sintomas associados. As características mais marcantes da migrânea são cefaleia unilateral, intensa e latejante, e essa cefaleia primária é o segundo distúrbio mais incapacitante do mundo e o primeiro entre as mulheres (IHME, 2016; KRAUSE et al., 2021).

A prevalência mundial da doença, segundo estudos (AHMED HAMED, 2010; BÖTTCHER et al., 2020; DOGAN et al., 2017), é três vezes maior em mulheres do que em homens. Há vários fatores que justificam essa maior prevalência de migrânea no sexo feminino. Dentre eles destacam-se as variações hormonais durante os ciclos menstruais, a menopausa e o uso de reposição hormonal na pós-menopausa (SERFATY, 2019; VOEDISCH; HINDIYEH, 2019). Outros fatores podem estar envolvidos no desencadeamento de crises de migrânea, como estilo de vida e fatores socioeconômicos (LE et al., 2011), presença de comorbidades, incluindo hipertensão (ENTONEN et al., 2014; PIETRINI; DE LUCA; DE SANTIS, 2005; WANG; WANG, 2021), uso de cigarro (PAYNE et al., 1991), consumo regular de álcool (AAMODT et al., 2006; DUELAND, 2015), obesidade (RIVERA-MANCILLA et al., 2021), depressão e ansiedade (PERES et al., 2017).

Acredita-se que há participação do neurotransmissor CGRP no desencadeamento das crises de migrânea, esse é produzido no gânglio trigeminal, levando à inflamação neurogênica e a vasodilatação (IYENGAR et al., 2019b). Ramos trigeminais se projetam para a periferia, inervam as artérias cerebrais, artérias meníngeas onde se projetam para partes da dura-máter que são altamente vascularizadas. Estudos imuno-histoquímicos de tecidos de ratos e humanos revelaram que as fibras C não mielinizadas, que inervam as artérias meníngeas e cerebrais, expressam CGRP, bem como substância P, VIP e nNOS (MELO-CARRILLO et al., 2017). Um estudo (GOADSBY; EDVINSSON; EKMAN, 1988) que realizou observações em pacientes submetidos à termocoagulação do gânglio trigeminal sob anestesia geral para o tratamento de tiques dolorosos, demonstrou que após a coleta de sangue da veia jugular, os níveis de CGRP no sangue foram 30 ± 2 pmol/l no grupo controle e 60 ± 11 pmol/l no grupo que recebeu a estimulação. Um outro estudo (SARCHIELLI et al., 2007b), avaliou a presença do CGRP no LCR de pacientes com migrânea através de ensaio imunorreativo, com concentração de 29.37 ± 4.67 pmol/l no grupo controle e 44.16 ± 4.63 pmol/l no grupo migrânea. Contudo, no presente estudo, não foi possível observar diferenças significativas no LCR de pacientes com migrânea e do grupo controle.

Estudos apontam que a OT desempenha um papel na supressão da dor no sistema nervoso central (POISBEAU; GRINEVICH; CHARLET, 2018), incluindo a prevenção da migrânea (TZABAZIS et al., 2017b). Além disso, a OT tem efeitos generalizados na regulação do humor e no comportamento (POISBEAU; GRINEVICH; CHARLET, 2018). Apesar de no LCR a OT ter uma meia-vida de aproximadamente 28 minutos, que é muito mais longa do que no sangue, i.e., 1 a 2 minutos, não foram identificadas diferenças significativas entre os níveis de OT no LCR de pacientes do grupo migrânea e os indivíduos do grupo controle. Um estudo (WANG et al., 2013b) mostrou que em indivíduos saudáveis a concentração de OT no LCR era significativamente maior em pacientes com migrânea ($33,21 \pm 6,37$ pg/ml vs. $16,38 \pm 4,53$ pg/ml, $p < 0,01$); também foi observada uma correlação entre a severidade da dor de cabeça e a concentração de OT no LCR.

Ademais, regiões hipotalâmicas que contribuem para o início da migrânea, também são relatadas como fontes de OT, com projeções por todo o encéfalo, medula espinal e neuro-hipófise (WARFVINGE et al., 2020; WARFVINGE; KRAUSE; EDVINSSON, 2020). Há relatos (WARFVINGE et al., 2020; WARFVINGE; KRAUSE; EDVINSSON, 2020) que identificaram receptores de OT expressos em áreas relacionadas à migrânea do sistema nervoso central, como núcleos trigeminais caudais e na medula espinal, e nos gânglios trigeminais, sugerindo uma influência no processamento da dor e na fisiopatologia da migrânea (KRAUSE et al., 2021; NAPPI et al., 2022).

O ON, que tem funções de alterar o tônus vascular e regular o de fluxo sanguíneo, também tem importante papel na modulação da dor (KINGWELL, 2000). Como supramencionado, o ON está presente nas fibras C que inervam as artérias cerebrais, sugerindo assim uma participação no mecanismo de ativação na migrânea (MELO-CARRILLO et al., 2017). O ON também tem sido associado à depressão, esquizofrenia e doença de Parkinson, indicando que há relação entre ele e os distúrbios neuronais (SAINI et al., 2021). Dentre as comorbidades relacionadas à migrânea, se destaca a depressão, corroborando mais uma vez com a relação que há entre as moléculas presentes nos distúrbios neuronais de forma geral e a migrânea (PERES et al., 2017). Um estudo (STEINBERG et al., 2010b) que analisou os níveis de NO no LCR de 14 pacientes com cefaleia em salvas, através do método de eletroforese capilar, observou que durante as crises os níveis de NO estavam aumentados (média $9.3 \mu\text{M}$, 95% CI 8.5–10.1) em comparação ao grupo controle (média $6.2 \mu\text{M}$, IC 95% 4.9 –7.5). Os resultados obtidos neste estudo em relação ao NO não demonstraram significância quando comparados grupo migrânea e grupo controle.

No presente estudo o LCR foi escolhido para utilização na tentativa de coletar uma substância em local mais próximo à liberação de CGRP, OT e ON. Estudos em humanos não permitem do ponto de vista ético avaliar a concentração desses neurohormônios em tecidos cerebrais. É esperado que moléculas envolvidas nos mecanismos que levam a migrânea estejam alteradas em pessoas com migrânea, contudo, isso pode ser observado em regiões específicas do cérebro, uma vez que no LCR as moléculas estão diluídas. Não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos migrânea e controle. Alguns poucos estudos mostraram diferenças estatísticas e, portanto, foram publicados. Isso pode representar um viés dos estudos com resultados negativos, quando não se publica por não haver diferenças estatísticas entre grupos experimentais. Nesses casos ou o artigo não é aceito ou os autores não se interessam em publicar resultados negativos. Esse é um grande problema na ciência experimental, deixando muitas vezes a falsa impressão de que há alteração de neurotransmissores em tecidos e compartimentos intracranianos em doenças diversas por se publicar estudos com resultados positivos, muitas vezes estudos esses com falhas metodológicas importantes.

6 CONCLUSÃO

Foi testada a hipótese de que há alterações nas concentrações de CGRP, OT e ON no LCR em pacientes com migrânea, contudo, a hipótese não foi apoiada com os dados obtidos neste estudo. Apesar disso, com base em diversos achados publicados por diversos grupos de pesquisa, é notável a participação destas moléculas nos mecanismos de ativação das crises de migrânea. Essa correlação, portanto, merece que outros trabalhos levantem a possibilidade do envolvimento dessas moléculas em outras regiões do encéfalo, colaborando com a elucidação da fisiopatologia da migrânea, podendo assim, contribuir com estratégias terapêuticas mais seletivas e eficazes, que atuem de forma preventiva nas crises de migrânea. Além disso, este estudo apresenta algumas limitações como: o n pequeno de amostras, os grupos são heterogêneos, os participantes faziam uso de diversos medicamentos e apresentavam estilos de vida variáveis, há possibilidade de outras comorbidades relacionadas a outras síndromes dolorosas.

REFERÊNCIAS

- AAMODT, A. H. et al. Headache prevalence related to smoking and alcohol use. The Head-HUNT Study. **European Journal of Neurology**, v. 13, n. 11, p. 1233–1238, 2006.
- AHMED HAMED, S. Blood pressure changes in patients with migraine: Evidences, controversial views and potential mechanisms of comorbidity Running title: Blood pressure changes with migraine. **iMedPub Journals**, v. 1, n. 22, p. 222-7.
- AKERMAN, S.; HOLLAND, P. R.; HOFFMANN, J. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: Dural trigeminovascular nociception. **Cephalalgia**, v. 33, n. 8, p. 577–592, 2013.
- AMARA, S. G. et al. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, v. 298, n. 5871, p. 240–244, 1982.
- ASHINA, M. et al. Human models of migraine - short-term pain for long-term gain. **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 12, p. 713–724, 2017.
- ASHINA, M. et al. Migraine: integrated approaches to clinical management and emerging treatments. **The Lancet**, v. 397, p. 1505-18, 2021a.
- ASHINA, M. et al. **Migraine: epidemiology and systems of care**. The Lancet, 17 abr. 2021b.
- BERNTSON, G. G. et al. Evolution of neuroarchitecture, multi-level analyses and calibrative reductionism. **Interface Focus**, v.2, n. 1, p. 65-73, 2012.
- BHARADWAJ, V. N. et al. Intranasal administration for pain: Oxytocin and other polypeptides. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 1088, 2021
- BØ, S. H. et al. Cerebrospinal fluid cytokine levels in migraine, tension-type headache and cervicogenic headache. **Cephalalgia**, v. 29, n. 3, p. 365–372, mar. 2009.
- BÖTTCHER, B. et al. Manifestation of migraine in adolescents: Does it change in puberty? **European Journal of Pediatric Neurology**, v. 26, p. 29–33, 2020.
- CARTER, C. S. et al. Oxytocin and Social Bonding. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 652, n. 1, p. 204–211, 1992.

CERNUDA-MOROLLON, E. et al. Interictal increase of CGRP levels in peripheral blood as a biomarker for chronic migraine. **Neurology**, v. 81, n. 14, p. 1191–1196, 2013.

CHARLES, A. The pathophysiology of migraine: implications for clinical management. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 174–182, 2018.

DEBBIE L. HAY, DAVID R. POYNER, A. R. Q. International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the Calcitonin Gene-Related Peptide Subtype 2 Receptor. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 143–145, 2008.

DIENER, H. C. CGRP antibodies for migraine prevention — new kids on the block. **Nature Reviews Neurology**, 2019.

DODICK, D. W. Migraine. **Endocrinology**, v. 391, n. 6, p. 1315–30, 2018.

DOGAN, V. B. et al. Hormonal effect on the relationship between migraine and female sexual dysfunction. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 9, p. 1651–1655, 1 set. 2017.

DOODS, H. et al. Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n. 3, p. 420-3, 2000.

DUELAND, A. N. Headache and Alcohol. **Headache**, v. 55, n. 7, p. 1045–1049, 2015.

EDVINSSON, L. Functional role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation. **Trends in Neurosciences**, v. 8, n. C, p. 126–131, 1985.

EDVINSSON, L. et al. Effect of the CGRP receptor antagonist BIBN4096BS in human cerebral, coronary and omental arteries and in SK-N-MC cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 49–53, 2002.

EDVINSSON, L. Novel migraine therapy with calcitonin gene-regulated peptide receptor antagonists. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 9, p. 1179–1188, 2007.

EDVINSSON, L. CGRP receptor antagonists and antibodies against CGRP and its receptor in migraine treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 193–199, 2015.

EDVINSSON, L. et al. CGRP as the target of new migraine therapies - Successful translation from bench to clinic. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 6, p. 338–350, 2018.

EDVINSSON, L. Role of CGRP in Migraine. 2019.

- EDVINSSON, L.; GOADSBY, P. J. Discovery of CGRP in relation to migraine. **Cephalalgia**, v. 39, n.3, p. 331-2, 2019.
- EDVINSSON, L.; LINDE, M. New Drug Class New drugs in migraine treatment and prophylaxis: telcagepant and topiramate. **Lancet**, v. 376, p. 645–55, 2010.
- EDVINSSON, L.; UDDMAN, R. Neurobiology in primary headaches. **Brain Research Reviews**, v. 48, n. 3, p. 438–456, 2005.
- EFTEKHARI, S. et al. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. **Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1289–1303, 2013.
- EIGENBRODT, A. K. et al. Diagnosis and management of migraine in ten steps. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 8, p. 501-514, 2021.
- ENTONEN, A. H. et al. Migraine predicts hypertension-a cohort study of the Finnish working-age population. **European Journal of Public Health**, v. 24, n. 2, p. 244–248, 2014.
- FERRARI, M. D. et al. Migraine pathophysiology: Lessons from mouse models and human genetics. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 1, p. 65–80, 2015.
- FONTEH, A. N. et al. Cerebrospinal fluid phospholipase C activity increases in migraine. **Cephalalgia**, v. 31, n. 4, p. 456–462, abr. 2011.
- GALLAI, V. et al. Glutamate and nitric oxide pathway in chronic daily headache: evidence from cerebrospinal fluid. **Cephalalgia**, v. 23, n.3, p. 166-74, 2003.
- GARCÍA-BOLL, E. et al. Inhibition of nociceptive dural input to the trigeminocervical complex through oxytocinergic transmission. **Experimental Neurology**, v. 323, p. 113079, 2020.
- GOADSBY, P. J. et al. Pathophysiology of Migraine: A Disorder of Sensory Processing. **Physiological reviews**, v. 97, n. 2, p. 553–622, 2017a.
- GOADSBY, P. J. et al. A Controlled Trial of Erenumab for Episodic Migraine. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 22, p. 2123–2132, 30 nov. 2017b.
- GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L. The trigeminovascular system and migraine: Studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. **Annals of Neurology**, v. 33, n. 1, p. 48–56, 1993.

GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L.; EKMAN, R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. **Annals of Neurology**, v. 28, n. 2, p. 183–187, 1990.

GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, X. L.; EKMAN, R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 2, p. 193–6, 1988.

GOODIN, B. R.; NESS, T. J.; ROBBINS, M. T. Oxytocin-A Multifunctional Analgesic for Chronic Deep Tissue Pain. **Curr. Pharm Des**, v. 21, n. 7, p. 906-913.

GROSS, E. C. et al. The metabolic face of migraine — from pathophysiology to treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 11, p. 627–643, 2019.

HARRINGTON, M. G. et al. Cerebrospinal fluid sodium increases in migraine. **Headache**, v. 46, n. 7, p. 1128–1135, 2006.

HARRINGTON, M. G. et al. Cerebrospinal fluid sodium rhythms. **Cerebrospinal Fluid Research**, v. 7, p. 1-9, 2010.

HAY, D. L. et al. Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 1, p. 3–17, 2018.

HAY, D. L.; WALKER, C. S. CGRP and its receptors. **Headache**, v. 57, n. 4, p. 625–636, 2017.

HO, T. W. et al. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. **The Lancet**, v. 372, p. 2115–23, 2008.

HO, T. W.; EDVINSSON, L.; GOADSBY, P. J. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 10, p. 573–582, 2010.

IHME. **Global Burden of Disease Study (2015)**.

INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. International classification of headache disorders. **Headache**, v. 53, n. 8, p. 1381–1382, 2013.

ISOBE, C.; TERAYAMA, Y. A remarkable increase in total homocysteine concentrations in the CSF of migraine patients with aura. **Headache**, v. 50, n. 10, p. 1561–1569, 2010.

IYENGAR, S. et al. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. **Headache**, v. 59, n. 5, p. 659–681, 2019a.

IYENGAR, S. et al. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. **Headache**, v. 59, n. 5, p. 659–81, 2019b.

JONES, P.; ROBINSON, I. Differential clearance of neurophysin and neurohypophysial peptides from the cerebrospinal fluid in conscious guinea pigs. **Neuroendocrinologia**, v. 34, p. 297–302, 1982.

KATSARAVA, Z. et al. Poor medical care for people with migraine in Europe – evidence from the Eurolight study. **Journal of Headache and Pain**, v. 19, n. 1, 2018.

KEE, Z.; KODJI, X.; BRAIN, S. D. The role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in neurogenic vasodilation and its cardioprotective effects. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–13, 2018.

KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB**, v. 14, n. 12, p. 1685–96, 2000.

KRAUSE, D. N. et al. Hormonal influences in migraine — interactions of estrogen, oxytocin and CGRP. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 10, p. 621–633, 20 out. 2021.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Annals of Surgery**, v. 221, n. 3, p. 220–235, 1995.

LE, H. et al. Association between migraine, lifestyle and socioeconomic factors: A population-based cross-sectional study. **Journal of Headache and Pain**, v. 12, n. 2, p. 157–172, 2011.

LIU, Y.; BROMAN, J.; EDVINSSON, L. Central projections of the sensory innervation of the rat middle meningeal artery. **Brain Research**, v. 1208, p. 103–110, 2008.

LOVE, T. M. Oxytocin, motivation and the role of dopamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 119, p. 49–60, 2014.

LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell**, v. 70, n. 5, p. 705–707, 1992.

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 1–98, 1995.

- MAHAJAN, R. et al. Oxytocin-Selective Nanogel Antibody Mimics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, 1 mar. 2022.
- MALLEE, J. J. et al. Receptor activity-modifying protein 1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 14294–14298, 2002.
- MAY, A. Understanding migraine as a cycling brain syndrome: reviewing the evidence from functional imaging. **Neurological Sciences**, v. 38, p. 125–130, 2017.
- MAY, A.; SCHULTE, L. H. Chronic migraine: Risk factors, mechanisms and treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 8, p. 455–464, 2016.
- MCLATCHIE, L. M. et al. RAMPS regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin- receptor-like receptor. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 333–339, 1998.
- MELO-CARRILLO, A. et al. Fremanezumab—a humanized monoclonal anti-CGRP antibody—inhibits thinly myelinated (A δ) but not unmyelinated (c) meningeal nociceptors. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 44, p. 10587–10596, 2017.
- MESSLINGER, K. et al. Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, n. 7, p. 1020–1024, 1995.
- MEYER, C. et al. Relationship between oxytocin release and amplitude of oxytocin cell neurosecretory bursts during suckling in the rat. **J. Endocr**, v. 114, n. 2, p. 263–70, 1987.
- MICHAEL G. ROSENFELD, JEAN-JACQUES MERMOD, S. G. A.; LARRY W. SWANSON T, PAUL E. SAWCHENKO T, JEAN RIVIER, W. W. V.; EVANS§, & R. M. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, v. 304, n. 5922, p. 129–135, 1983.
- MUDDHRRY, P. K. et al. Differential expression of α -CGRP and β -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 195–205, 1988.
- NAPPI, R. E. et al. Role of Estrogens in Menstrual Migraine. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1355, 2022.
- NICKERSON, K. et al. Oxytocin and milk ejection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 67, n. 5, p. 1028–1034, 1954.

NOSEDA, R.; BURSTEIN, R. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. **Pain**, v. 154, n. 1, 2013.

NYHOLT, D. R.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. J. M. Genome-wide association studies in migraine: Current state and route to follow. **Current Opinion in Neurology**, v. 29, n. 3, p. 302–308, 2016.

OLESEN, J. et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine. **N Engl J Med**, v. 350, 11, p. 1104-10.

OLESEN, J. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. **Cephalalgia**, v. 38, n. 1, p. 1–211, 2018.

PAYNE, T. J. et al. The Impact of Cigarette Smoking on Headache Activity in Headache Patients. **Headache**, v. 31, n. 5, p. 329–32, 1991.

PERES, M. F. P. et al. Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. **Cephalalgia**, v. 24, n. 9, p. 735–739, set. 2004.

PERES, M. F. P. et al. Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. **Journal of Headache and Pain**, v. 18, n. 1, 2017.

PETERSEN, K. A. et al. Presence and function of the calcitonin gene-related peptide receptor on rat pial arteries investigated in vitro and in vivo. **Cephalgia**, v. 25, p. 424–32, 2005.

PIETRINI, U.; DE LUCA, M.; DE SANTIS, G. Hypertension in headache patients? A clinical study. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 112, n. 4, p. 259–264, out. 2005.

POISBEAU, P.; GRINEVICH, V.; CHARLET, A. Oxytocin signaling in pain: Cellular, circuit, system, and behavioral levels. In: **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. Springer Verlag, 2018. v. 35p. 193–211.

POYNER, DAVID; SEXTON, PATRICK; MARSHALL, IAN; SMITH, DAVID; QUIRION; REMI; BORN, WALTER; MUFF, R. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 233–246, 2002.

- PULEDDA, F.; MESSINA, R.; GOADSBY, P. J. An update on migraine: current understanding and future directions. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 9, p. 2031–2039, 2017.
- RIVERA-MANCILLA, E. et al. Metabolic Aspects of Migraine: Association With Obesity and Diabetes Mellitus. **Frontiers in Neurology**, v. 12, 2021.
- ROHMANN, J. L. et al. Migraine, headache, and mortality in women: A cohort study. **Journal of Headache and Pain**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2020.
- ROSENBLUM, IRA; STEIN, A. A. A COMPARISON OF THE RESPONSES TO 1-SPARTEINE AND OXYTOCIN IN ISOLATED HUMAN UTERINE MUSCLES. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 144, n. 1, p. 138–141, 1964.
- ROSENFELD, M.; AMARA, S.; EVANS, R. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. **Science**, v. 225, n. 4668, p. 1315–1320, 1984.
- RUJAN, R.-M.; REYNOLDS, C. A. Calcitonin Gene-Related Peptide Antagonists and Therapeutic Antibodies. *Handb Exp Pharmacol.*, v. 255, p.169-92, 2019.
- RUSSELL, F. A. et al. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1099–1142, 2014.
- SAINI, R. et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Neutrophils: An Insight. In: **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021. v. 180, p. 49–83.
- SAKKA, L.; COLL, G.; CHAZAL, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. **European Annals of Otorhinolaryngology**, v. 128, n.6, p. 309-16, 2011.
- SARCHIELLI, P. et al. Endocannabinoids in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 1384–1390, 2007a.
- SARCHIELLI, P. et al. Endocannabinoids in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 1384–1390, 2007b.
- SCHUSTER, N. M.; RAPOPORT, A. M. New strategies for the treatment and prevention of primary headache disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 11, p. 635-50, 2016.
- SERFATY, D. Update on the contraceptive contraindications. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v48, n. 5, p. 297-307, 2019.

- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, 2007.
- SHI, L. et al. Pharmacologic Characterization of AMG 334, a Potent and Selective Human Monoclonal Antibody against the Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 356, n. 1, p. 223–231, 2016.
- SILBERSTEIN, S. D. et al. Fremanezumab for the Preventive Treatment of Chronic Migraine. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 22, p. 2113–2122, 2017.
- SOMASUNDARAM, C. et al. Adventitial neuronal somata. **Journal of Vascular Research**, v. 43, n. 3, p. 278–288, 2006.
- STAM, A. H. et al. Shared genetic factors in migraine and depression: Evidence from a genetic isolate. **Neurology**, v. 74, n. 4, p. 288–294, 2010.
- STEINBERG, A. et al. Levels of nitric oxide metabolites in cerebrospinal fluid in cluster headache. **Cephalalgia**, v. 30, n. 6, p. 696–702, jun. 2010a.
- STEINBERG, A. et al. Levels of nitric oxide metabolites in cerebrospinal fluid in cluster headache. **Cephalalgia**, v. 30, n. 6, p. 696–702, jun. 2010b.
- STOVNER, L. J. et al. Global, regional, and national burden of migraine and tension-type headache, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 954–976, 2018.
- SWANSON, L. W.; MCKELLAR, S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v. 188, n. 1, p. 87–106, 1979.
- TEPPER, S. J. Editorial: International classification of headache disorders, 3rd Edition, beta version. **Headache**, v. 53, n. 8, p. 1381–1382, 2018.
- TZABAZIS, A. et al. Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. **Cephalalgia: an international journal of headache**, v. 36, n. 10, p. 943–50, 2016.
- TZABAZIS, A. et al. Oxytocin and Migraine Headache. **Headache**, v. 57, p. 64–75, 2017a.
- TZABAZIS, A. et al. Oxytocin and Migraine Headache. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 57, p. 64–75, 2017b.

UNGER, J. W.; LANGE, W. Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 4, n. 4, p. 299–309, 1991.

VECSERNYÉS, M. et al. Presence of chromatographically identified oxytocin in human sensory ganglia. **Brain Research**, v. 414, n. 1, p. 153–154, 1987.

VIEIRA, D. S. D. S. et al. Glutamate levels in cerebrospinal fluid and triptans overuse in chronic migraine. **Headache**, v. 47, n. 6, p. 842–847, 2007.

VOEDISCH, A. J.; HINDIYEH, N. Combined hormonal contraception and migraine: Are we being too strict? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 31, n. 6, p.452-8, 2019.

VONGVAIVANICH, K. et al. Late-life migraine accompaniments: A narrative review. **Cephalalgia**, v. 35, n. 10, p. 894-911, 2015.

WANG, Y. F.; WANG, S. J. Hypertension and Migraine: Time to Revisit the Evidence. **Current Pain and Headache Reports**, v. 25, n.9, p.58, 2021.

WANG, Y. L. et al. The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. **Neuropeptides**, v. 47, n. 2, p. 93–97, abr. 2013a.

WANG, Y. L. et al. The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. **Neuropeptides**, v. 47, n. 2, p. 93–97, abr. 2013b.

WARFVINGE, K. et al. Oxytocin as a regulatory neuropeptide in the trigeminovascular system: Localization, expression and function of oxytocin and oxytocin receptors. **Cephalalgia**, v. 40, n. 12, p. 1283–1295, 1 out. 2020.

WARFVINGE, K.; KRAUSE, D.; EDVINSSON, L. The distribution of oxytocin and the oxytocin receptor in rat brain: Relation to regions active in migraine. **Journal of Headache and Pain**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2020.

WATTIEZ, A.-S.; WANG, M.; RUSSO, A. F. CGRP in Animal Models of Migraine. *Handb Exp Pharmacol*, v. 255, p. 85-107, 2019.

WEATHERALL, M. W. The migraine theories of Liveing and Latham: A reappraisal. **Brain**, v. 135, n. 8, p. 2560–2568, 2012.

APÊNDICE A
QUADRO COM DADOS GERAIS DOS PACIENTES

Nº	Sexo	Enxaqueca	Idade	Hipertensão	Diabetes	Insuficiência cardíaca	Fumante	Álcool	Anticoncepcional	TRH	Antidepressivo	Vitamina D	OT	NO	CGRP	Observações
1	M	Não	30	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,199131	7,007143	0,073263	
2	M	Sim	44	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,263783	13,67143	0,085273	
3	F	Não	35	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	0,294407	5,035714	—	
4	F	Sim	48	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,195912	3,257143	0,096011	
5	M	Sim	57	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,109289	11,85	0,09068	
6	F	Não	66	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,780467	21,04286	0,094048	
7	F	Sim	30	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,21825	6,921429	0,090818	
8	M	Não	19	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,899086	8,55	0,089917	
9	M	Não	34	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,27138	7,564286	0,07992	
10	M	Não	32	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	0,20807	25,43571	0,079155	
11	M	Não	69	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,255884	10,24286	0,093385	
12	F	Sim	47	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,399683	5,485714	0,072536	
13	M	Não	58	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,34504	10,71429	0,07291	
14	F	Sim	35	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	0,202948	28,99286	—	
15	M	Sim	51	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,349779	9,492857	0,093466	
16	F	Não	67	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,37978	13,13571	0,08033	Losartana
17	F	Não	28	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	0,377706	5,25	0,119524	
18	F	Sim	42	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	1,252285	51,66429	—	
19	M	Não	20	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	0,154266	5,892857	—	
20	F	Não	58	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	0,254659	20,93571	—	AVC, losartana, metformina, HZT, sinvastatina
21	M	Não	35	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0,268866	14,76429	0,075555	
22	M	Não	58	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0,355811	20,29286	0,102349	Medicação: diazepam
23	M	Não	49	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0,299853	4,221429	0,077476	
24	F	Sim	50	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0,429208	—	0,145354	Medicamentos: enalapril, hidroclorotiazida, rivotril, omeprazol.
25	F	Sim	72	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	0,386489	8,078571	0,102203	Medicamentos: pantoprazol, domperidona, romipril, clortalidona e metformina.
26	F	Sim	57	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	0,357273	38,20714	0,076001	Doença: Mieloma múltiplo. Medicações: tramal, dipirona, cefalotina.
27	F	Sim	41	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	0,28623	—	0,06871	

APÊNDICE B
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Preview (ANP-2021-0208.R1)**From:** teiveads@mps.com.br**To:** ferreira.rosanasouza@gmail.com**CC:****Subject:** Arquivos de Neuro-Psiquiatria - Decision on Manuscript ID ANP-2021-0208.R1**Body:** 22-Mar-2022

Dear Dr. Ferreira:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Storage and purification adaptations for the isolation of total RNA from the dura mater" in its current form for publication in the Arquivos de Neuro-Psiquiatria. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivos de Neuro-Psiquiatria, we look forward to your continued contributions to the Journal.

On July 1, 2015, SciELO will start to use a CC-BY license for all the publications in its collection. What does this mean? All open-access systems need a license within the Creative Commons (CC) system so that they can operate without legal problems. The license most used within our setting (and also by Arquivos de Neuro-Psiquiatria) is the CC-BY-NC license, which presents some restrictions on how the information contained in the articles thus published is used. These restrictions are of a commercial nature: they do not apply to our journal, but they end up impairing its visibility in the open-access system. The new CC-BY license ensures broader access to the articles published. SciELO has provided the following explanation: " ... Among all the licenses, CC-BY is the one that is most effective for maximizing the dissemination of information, given that it is the least restrictive, provides a greater degree of freedom to reuse content and, like the other licenses, ensures that authorship is properly credited to the author or authors, and to the periodical or other means through which the article was originally published. This has the effect that the CC-BY license is the one that presents greatest compatibility when combined with other types of license, i.e. the content is released to fully interoperate with a wide variety of different systems and services, including commercial systems and services."

Sincerely,

Prof. Hélio A. G. Teive
Editor-in-Chief, Arquivos de Neuro-Psiquiatria
teiveads@mps.com.br

APÊNDICE C
ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO

Received: 3 May 2020 | Accepted: 30 October 2020
DOI: 10.1111/head.14045

RESEARCH SUBMISSIONS

Secondary stabbing headache associated with intracranial tumors, aneurysms, and arteriovenous malformation: An alarming warning sign

Marcelo Moraes Valença MD, PhD, FAHS¹ |

Hildo Rocha Cirne de Azevedo Filho MD, PhD, FRCS² |

Maria Rosana de Souza Ferreira MSc¹ | Marcelo Andrade Valença¹ |

About Valentyn Krymchankowski MD, PhD, FAHS³ | Martina Falcão Valença MD⁴ |

Luciana Patrícia Alves Andrade-Valença MD, PhD¹

¹Neurology and Neurosurgery Unit, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Department of Neurosurgery, Hospital da Restauração, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

³Headache Center of Rio, Rio de Janeiro, Brazil

⁴INI International Neuroscience Institute, Hannover, Germany

Correspondence

Marcelo Moraes Valença, Neurosurgery Unit, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.
Email: mmvalenca@yahoo.com.br

Abstract

Background: Stabbing headache (SH) is considered as a pure primary headache, but according to a few clinical observations it could also be secondary. Over the past decades, we have been observing the complaint of SH in patients with intracranial vascular and neoplastic lesions.

Objective: To describe a series of patients with intracranial lesions who experienced SH.

Methods: This is a cross-sectional, retrospective study of 34 patients with intracranial lesions associated with SH, admitted at Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Results: In this series of 34 patients [29 women, 44 ± 12 years (mean ± SD)] with secondary SH, the causes were intracranial neoplasms (*n* = 31), cerebral aneurysms (*n* = 2), or arteriovenous malformation (*n* = 1). Pituitary tumor (*n* = 18), meningioma (*n* = 6), and vestibular schwannomas (*n* = 4) were the most prevalent types of intracranial neoplasms. All these lesions had intimate contact with the dura mater, including an oligodendroglioma, the only intra-axial tumor in the series. A characteristic in the secondary SH is the crescendo pattern (12/34, 35%), progressing from infrequent attacks to recurrent crises occurring several times a day. The SH lasted from 5 days to 60 months (15 ± 18 months, mean ± SD) until the correct diagnosis [16/34 (47%) of the patients ≤ 6 months]. The SH was triggered by the movement of the head (5/34, 15%) or Valsalva maneuver (1/34). After surgery, suppression of the SH was observed. In a few of the patients to whom dexamethasone was prescribed, the SH subsided within a few days.

Conclusion: This study was able to identify clinical red flags associated with intracranial lesions and secondary SH, for example, recent onset of SH, exclusively unilateral (ipsilateral) at the same location, crescendo pattern, triggered by head movements, or Valsalva maneuver.



The parietal foramen anatomy: studies using dry skulls, cadaver and in vivo MRI

Maria Rosana de Souza Ferreira^{1,3,5} · André Pukey Oliveira Galvão^{1,2} ·
 Pedro Thadeu Mertens Brainer de Queiroz Lima³ · Alessandra Mertens Brainer de Queiroz Lima⁴ ·
 Carolina Peixoto Magalhães¹ · Marcelo Moraes Valença³

Received: 21 September 2020 / Accepted: 5 December 2020
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag France SAS part of Springer Nature 2021

Abstract

Objective The aim of this study was to describe the anatomical features encountered in the parietal foramen in a series of 178 human bones and 123 head MRI examinations. A cadaveric specimen was also dissected to demonstrate the trajectory of a superficial scalp vein through the parietal foramen as far as the dura mater. A literature review was performed regarding prevalence of parietal foramen in different populations.

Methods Totally, 178 paired adult bones were used to investigate the presence, shape and number of the parietal foramina. In addition, 123 brain MRI examinations were also studied.

Results The parietal foramina were encountered in 75/89 (84.3%) skulls (32/38 (84.2%) in women vs. 43/51 (84.3%) in men, $p > 0.05$). The parietal foramen was present bilaterally in 44.73% of females and 54.9% of males. Regarding unilaterality of the parietal foramen, a right or left laterality was observed in female 21% right versus 18% left; and 16% versus 14% (left) in males ($p > 0.05$). The accessory parietal foramen was present in the right parietal in 2.6% and in 7.9% on the left side of the females, while 5.9% and 3.9% of the males on the right or left sides, respectively. The parietal foramina located in the proximity of the sagittal suture (male 7.1 ± 2.5 mm vs. female, 7.4 ± 2.7 mm). There was a positive correlation between the right and left parietal foramina regarding the distance from the median line. The distance from a foramen to the contralateral one was 16 ± 4 mm in men and 18 ± 5 mm in women, respectively ($p > 0.05$).

Conclusion No major differences were encountered between sexes regarding the anatomical features of parietal foramen.

Keywords Human skull · Parietal foramen · Morphology · Sex difference

Introduction

Very little attention has been paid to the parietal foramen, an often symmetrical bilateral anatomical structures with a function of extreme importance in controlling intracranial temperature and maintaining intracranial pressure in the various positions of the head in relation to the body during daily activities. Often during different approaches to reach intracranial structures, used in neurosurgery procedures, the surgeon has to observe the parietal foramen and the respective nerve and vessels that pass through it, to preserve functions. As there are several other communication routes between the intracranial cavity and the outer part of the head, e.g., scalp, damage to the foramen usually does not cause significant disturbances (or clinically noticeable) in the functions linked with vessels (venous and arterial) and nerve that travel through it.

✉ Maria Rosana de Souza Ferreira
ferreira.rosanasouza@gmail.com

¹ Departamento de Anatomia, Academic Center of Vitória of Santo Antão, Vitória, Pernambuco, Brazil

² Vitória de Santo Antão, Facol University Center, Vitória, Pernambuco, Brazil

³ Neurosurgery Unit, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Procape, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁵ Departamento de Anatomia and Neurosurgery Unit, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

APÊNDICE D
ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA CEPHALALGIA

Analysis of CGRP, oxytocin and nitric oxide in CSF in patients with migraine: an original study and review

Maria Rosana de Souza Ferreira, MSc¹, Henry Martins Soares Fortes², Willianne Emanuelle Rodrigues Costa³, Danyelly Bruneska Gondim Martins, PhD¹, MD, José Antunes-Rodrigues, MD, PhD⁴, Marcelo Moraes Valença, MD, PhD^{2,5}

¹Molecular and Bioinformatics Prospecting Group, Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ²Medical School, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil; ³Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ⁴Laboratory of Neuroendocrinology of the Department of Physiology of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁵Departamento de Neuropsiquiatria, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Corresponding author: Marcelo Moraes Valença

Department of Neurology and Neurosurgery, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

President, Brazilian Headache Society (2021-2024)

Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901, Cidade Universitária, Recife - PE, Brazil.

E-mail: mmvalenca@yahoo.com.br

Tel: +55 81 21268484

Abstract

Background: Headache attacks in patients with primary headaches, such as migraine and cluster headache, occur with concomitant changes in head blood flow and the secretory pattern of various neurotransmitters or neuromodulators. CGRP, oxytocin, and nitric oxide (NO) are some biomolecules altered during a headache attack, suggesting active participation in the physiopathological process. Our objective was to evaluate the concentrations of CGRP, oxytocin, and NO in the CSF of patients with and without

migraine. A brief review of the presence of these biomolecules in CSF in patients with migraine was also carried out. **Methods:** Twenty-seven (14 women, age 48 ± 14 years) patients were selected for CSF collection during spinal anesthesia. Migraine was diagnosed in 12 patients (9 women). **Results:** The concentrations of CGRP, oxytocin, and NO in the CSF in the migraine and control groups were: CGRP, migraine 0.09 ± 0.02 pg/ml vs. control 0.09 ± 0.01 pg/ml ($p=0.674$); Oxytocin, migraine 0.37 ± 0.29 pg/ml vs. control 0.36 ± 0.21 pg/ml ($p=0.904$); Nitric oxide, migraine 17.76 ± 16.29 μ mol/l vs. control 12.01 ± 6.93 μ mol/l ($p=0.643$). No statistical differences were observed when comparing CGRP [men 0.08 ± 0.01 pg/ml vs. women 0.09 ± 0.02 pg/ml ($p=0.186$)], oxytocin [men 0.31 ± 0.19 pg/ml vs. women 0.42 ± 0.28 pg/ml ($p=0.094$)]; and NO [men 11.52 ± 5.93 vs. women 17.33 ± 15.45 ($p=0.219$)] concentrations in the CSF between the sexes, regardless of whether the individual has migraine or not. **Conclusion:** The hypothesis that there is a change in CGRP, OT, and NO concentrations in CSF in patients with migraine was tested in the pain-free (interictal) interval; however, the hypothesis was not supported by the data obtained in this study. Nevertheless, based on several findings, the participation of these molecules in the mechanisms of activation of migraine attacks is remarkable. This correlation, therefore, deserves that other studies raise the possibility of the involvement of these molecules in distinct regions of the brain, collaborating with the elucidation of the pathophysiology of migraine.

Keywords: Cerebrospinal fluid. Migraine. CGRP. Oxytocin. Nitric oxide.

Introduction

Headache attacks in patients with primary headaches, such as migraine and cluster headache, occur with a concomitant change in head blood flow (intra- and extracranial) and changes in the secretory pattern of various neurotransmitters or neuromodulators (1–6). Calcitonin gene-related peptide (CGRP), oxytocin (OT), and nitric oxide (NO) are some biomolecules altered during a headache attack, suggesting active participation in the physiopathological process (7–15).

The migraine rate is approximately 10% in the general population, and it is the most prevalent neurological disease in the world (16). Migraine is a chronic neurological disorder, represented by moderate or severe headache attacks, associated with reversible neurological and systemic symptoms (17). Photo- and phonophobia, cutaneous allodynia, and gastrointestinal symptoms such as nausea and vomiting are typically encountered in migraine attacks (18). Some factors may be related to the occurrence (intensity and severity) of headache attacks,(7, 8) such as lifestyles, socioeconomic (19) and sex-linked factors (20–22), as well as presence of comorbidities, including hypertension (23–25), cigarette use (26) and regular alcohol consumption (27,28), obesity (29), depression and anxiety (30).

This fluctuation in the pattern of the severity of headache attacks in a patient with migraine and corresponded comorbidities throughout life involves a very complex process involving different cell types in the nervous system, with synaptogenesis, alteration in the synthesis and release of neurotransmitters, and formation of distinct neuronal networks. Stimulatory and inhibitory neural circuits are necessary for regulating patterns responsible for the frequency, intensities, and thresholds of responses to possible triggers. Such biological changes occur not only in the central nervous system but also in the periphery, with intense communication between these two components in a bidirectional manner.

Experimental studies demonstrated that the release of vasoactive neuropeptides plays a role in the physiopathology of a migraine crisis. The CGRP is a sensory neuropeptide with potent cardiovascular effects, with wide distribution in the nervous system, and exerts a paramount action on the genesis of a migraine crisis (31,32). In the trigeminovascular system, including the trigeminal ganglion, CGRP is released from nerve fibers that run along the dural, pial and cerebral arteries (33,34).

This fact shows that CGRP is directly linked to triggering a migraine attack, but other neuronal messengers are also involved. For example, NO may stimulate CGRP release and, thus, activate the trigeminovascular system (35,36). Nitric oxide is a small lipophilic molecule released from endothelial and neuronal cells and the immune system. It can cross the endothelium to vascular smooth muscle to exert vasoactive actions (37).

Furthermore, OT is involved in the inhibitory modulation of pain (38). Neurons in the central nervous system have been shown to possess OT receptors (39). Oxytocin receptors have been identified in several tissues, such as the spinal cord (40), trigeminal ganglion (41), and nerve terminals of hypothalamic neurons (42), among others.

On the other hand, Bharadwaj and coworkers (43) raised the hypothesis linking OT to menstrual migraine, arguing that, in the central nervous system, OT acts as a hypothalamic hormone/neurotransmitter and binds to specific receptors, which may inhibit trigeminal neuronal excitability that can promote migraine pain.

Still, with this same line of reasoning, Warfvinge and colleagues (44) compared OT and its receptors distribution in the central nervous system with CGRP (three mappings) to study possible relationships in regions associated with migraine, i.e., "migraine generators." The authors concluded that OT pathways might play a role in migraine attacks.

In addition, in patients with intractable cancer and severe pain, intraventricular administration of OT alleviates pain (45,46). A previous study (47) demonstrated that OT concentration in the cerebrospinal fluid (CSF) increased significantly in headache patients, and it was also observed a positive relationship between headache intensity and OT concentration in CSF.

Scientific evidence suggests that migraine has a strong genetic influence; therefore, migraineurs' brains work differently from those of people who do not suffer from migraine. Synaptic organization and neurotransmitter release are possibly distinct in these two groups of individuals. Thus, the hypothesis is that there are differences in one or more neuromodulators of brain function in the interictal period between migraineurs and healthy individuals that do not suffer from migraine.

Several studies are available in the literature, but very few make a clear relationship between the molecules present in the CSF and the migraine process (48–57);

therefore, our objective was to analyze the levels of CGRP, NO, and OT in the CSF in the interictal period in adult individuals. A brief review of the presence of these biomolecules in CSF of patients with migraine was also carried out in the present study.

Method

Patients

Twenty-seven patients were selected in the preoperative period for CSF collection during spinal anesthesia between March and August 2019. To classify patients treated at Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil, in the migraine or control groups, diagnostic criteria based on the *International Classification of Headache 3* were used (58). Patients with migraine had at least one headache attack in the last month before the lumbar puncture, and all were in the interictal interval.

The study has ethical approval and consent for participation, according to the ethics guidelines of the Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, through protocol CAAE 99301018.0.0000.5208.

Sample

To perform the analyses, 500 µL of CSF was collected from each patient by the aspiration method during spinal anesthesia and stored in empty Eppendorf tubes. After collection, the samples were stored in a freezer at -80°C until the material was analyzed.

Nitric oxide measurement

The NO concentration was measured by the amount of nitrate obtained by the NO/ozone chemiluminescence technique. The procedures were performed using 20 µL of CSF, deproteinized by incubation with 40 µL of 95% ethanol at 4°C for 30 minutes, and centrifuged for 5 minutes at 5,000 g. The supernatants (10 µL) from each sample were injected into a reaction vessel containing a reducing agent (0.8% vanadium chloride in 1N HCl at 95°C) that converts nitrate to NO in equimolar amounts. Nitric oxide NO was aspirated using helium gas into the chemiluminescence chamber of the Sievers NO Analysis apparatus (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, USA). The detection of NO results from its reaction with ozone, emitting red light that is detected and converted into an electrical signal.

CGRP measurement

The immunoenzymatic assay detected and quantified CGRP using the CGRP kit (rat) ELISA kit (Bertin Pharma, France). As CGRP was possibly present in the sample at a low concentration, the buffer dilution was not performed (as suggested in the manual).

Each well of the plate was rinsed five times with wash buffer (300 μ L/well). Before dispensing reagents and samples, the buffer was removed from the wells by inverting the plate and dangling the last drops on a paper towel. When pipetting the reagents, 100 μ L of NBS was dispensed into three wells; 100 μ L of standard CGRP was pipetted at different concentrations into eight wells; 100 μ L of the sample was dispensed into the wells; 100 μ L of the marker was pipetted into each well, except where the blank was. Then, the plate was incubated at -4°C for 20 hours. After the end of the established time, the plate was emptied, and the wells were washed five times with 300 μ L of wash buffer. At the end of the washes, 200 μ L of Ellman's Reagent was added to each of the 96 wells. The plate was read using the Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific) at a wavelength between 405 and 414 nm. This CGRP kit detects human α/β -CGRP and rat CGRP equally (the antibody has 100% cross-reactivity to α/β -CGRP).

Oxytocin measurement

The dosage of OT was performed using the technique of specific radioimmunoassay in duplicate. The assays used rabbit antisera, standard peptide for ^{125}I labeling, and goat anti-IgG antiserum. For the determination of OT concentrations, the buffers Na_2HPO_4 (0.062M) and $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (0.013M) with 0.5% BSA at pH 7.5 were used, and the peptide labeled with ^{125}I was from a commercial source (Dupont Co., Boston, MA, USA).

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the type of distribution of the studied variables. When the variables had a normal distribution, we used parametric tests (t-test); otherwise, the non-parametric Mann-Whitney test was used to two groups. The level of significance considered statistically different was $p < 0.05$. The data are shown as mean $\pm$ SD.

Biomarkers in the CSF

A search for biomarkers identified in the CSF of patients with migraine or headache was performed. The search was performed in the PubMed database, using the MeSH descriptors. The search for articles was performed following the flowchart in Figure 1.

Results

Cerebrospinal fluid samples were collected from 27 patients (14 women, age 48 ± 14 years) who underwent elective surgeries. Following the ICHD-3 (58) criteria, migraine was diagnosed in 12 patients (48 ± 11 years of age), 3 men (51 ± 7 years of age) and 9 women (age 47 ± 7 years of age).

In Figure 2, the concentrations of CGRP, OT, and NO in the CSF are shown in the migraine and control groups: [CGRP, migraine 0.09 ± 0.02 pg/ml vs. control 0.09 ± 0.01 pg/ml ($p=0.674$, Mann-Whitney test); OT, migraine 0.37 ± 0.29 pg/ml vs. control 0.36 ± 0.21 pg/ml ($p=0.904$ Mann-Whitney test); ON, migraine 17.76 ± 16.29 μ mol/l vs. control 12.01 ± 6.93 μ mol/l ($p=0.643$ Mann-Whitney test)].

No statistical differences were observed when comparing CGRP concentration [men ($n=12$) 0.08 ± 0.01 pg/ml vs. women 0.09 ± 0.02 pg/ml ($n=10$) ($p=0.186$ unpaired t-test)], OT concentration [men ($n=13$) 0.31 ± 0.19 pg/ml vs. women ($n=14$) 0.42 ± 0.28 pg/ml ($p=0.094$, Mann-Whitney test)]; and NO concentration [men ($n=13$) 11.52 ± 5.93 vs. women ($n=12$) 17.33 ± 15.45 ($n=25$) ($p=0.219$, unpaired t-test)] in the CSF between the sexes, regardless of whether the individual has migraine or not.

The concentration of CGRP in the CSF was 0.09 ± 0.03 pg/ml in women with migraine ($n=7$), and in men with migraine 0.09 ± 0.01 pg/ml ($n=3$) ($p>0.999$, Mann-Whitney test). In the women of the control group, the value was 0.10 ± 0.02 pg/ml ($n=3$) and in the men of the control group 0.08 ± 0.01 pg/ml ($n=9$), in the statistical comparison of the groups $p=0.100$, Mann-Whitney test.

In women with migraine, the OT concentration in CSF was 0.41 ± 0.33 pg/ml ($n=9$), while in men it was 0.24 ± 0.12 pg/ml ($n=3$) ($p=0.281$, Mann-Whitney test). The control group had a concentration of 0.42 ± 0.21 pg/ml in women ($n=5$) and 0.33 ± 0.21 pg/ml in men ($n=10$) ($p=0.112$ Mann-Whitney test).

Nitric oxide in the group of women with migraine had a mean level of 20.37 ± 19.2 μ mol/l ($n=7$), in men the value was 11.67 ± 2.10 μ mol/l ($n=3$) in the statistical comparison of the groups, the p-value was 0.833 (Mann-Whitney test). In the control group, the concentrations were 13.08 ± 7.92 μ mol/l in women ($n=5$) and 11.47 ± 6.78 μ mol/l in men ($n=10$) ($p=0.686$ unpaired t-test).

Discussion

In this study, we evaluated the CSF concentrations of three critical neurotransmitters that play an essential role in the pathophysiology of migraine - CGRP, OT, and nitric oxide. When we compared the concentrations of these possible migraine biomarkers, we found no statistical differences between the group without migraine and the group with migraine.

The CGRP concentration in the CSF was measured in patients with multiple sclerosis and Alzheimer's disease and a control group of healthy individuals. There was no difference between multiple sclerosis patients and controls, but a lower CGRP concentration was observed in dementia patients. The authors suggested that CGRP in the CSF may be possible dementia and depression marker. At least in the intercritical period in patients with migraine, there was no difference in the levels found in the CSF when compared with the group that did not suffer from migraine. During the pain period, the concentration of CGRP was higher in the jugular blood, according to previous studies (59). As far as we know, no study evaluated the concentrations of CGRP, OT, and NO in CSF in patients with migraine at the time of headache. Wang et al. (54) reported that OT concentration in CSF was higher in Chinese patients with headache (a mixed group with migraineurs and tension-type headache sufferers) - 33.21 ± 6.37 pg/ml versus 16.38 ± 4.53 pg/ml in the health volunteers, $p < 0.01$. The patients in this study received monetary compensation and were instructed to collect the CSF samples only "during the patients filling ill of headache". The data from pain-free period in these patients were no available. The levels of OT in CSF increased with the degree of intensity of pain in these patients with headache (54).

In a previous report (60), CGRP-LI was analyzed in CSF in the postoperative period in patients with acute subarachnoid hemorrhage (SAH), a clinical neurological condition when the individuals usually suffer the worst headache of their life. The CGRP-LI concentration was measurable in the CSF of SAH patients but not in the CSF of controls. Furthermore, increased levels of CGRP-LI (up to 14 pmol/L) were detected in those patients with significant vasoconstriction (60). They proved that the concentration of CGRP increases in the CSF in conditions of extreme pain and intracranial vasoconstriction (60), linking the CGRP with the association of pain-vascular caliber changes.

In a recent study, the authors measured the CGRP outflow into jugular blood and cerebrospinal fluid, considering a permeance for CGRP of rat dura mater. They concluded that, although it was a small fraction, the CGRP, when applied onto the rat dura mater, was able to reach the jugular blood and CSF (59). Thus, at least part of the CGRP detected in the CSF may originate from CGRP molecules released in the periphery, such as the dura mater. On the other hand, intracerebral arteries, the Willis' circle, or even pial arteries are in close contact with the CSF in the subarachnoid or Vichow's perivascular space. Thus, it is reasonable to assume that part of the CGRP found in CSF may originate from neuronal terminals that innervate these vessels. In addition, immunoreactive to CGRP afferent fibers that originate in the trigeminal ganglion project to the spinal trigeminal nucleus (61).

In an elegant experiment in rats, the blood flow in the dura mater and the medulla oblongata was registered while the application of 60 mM KCl stimulated the dura mater. As a result, a decreased meningeal blood flow was observed; oppositely, the medullary blood flow was increased. Concomitantly, increased CGRP concentrations in jugular plasma and CSF were also observed. The authors concluded that augmented blood supply of the medulla oblongata and CGRP release into the CSF might also occur in headaches due to strong activation of meningeal dural afferents (62).

It is believed that CGRP plays a role in triggering migraine attacks, it is released by the trigeminal ganglion neurons, leading to neurogenic inflammation and vasodilation (63). Immunohistochemical studies of rat and human tissues revealed that the unmyelinated C fibers that innervate the meningeal and cerebral arteries express CGRP, as well as substance P, VIP, and nNOS (64). A study (65) who carried out observations in patients undergoing thermocoagulation of the trigeminal ganglion under general anesthesia for the treatment of painful tics, showed that after blood collection from the jugular vein, blood CGRP levels were 30 ± 2 pmol/l in the control group and 60 ± 11 pmol/l in the group that received the stimulation. Another study (66), evaluated the presence of CGRP in the CSF of patients with migraine through an immunoreactive assay, with a concentration of 29.37 ± 4.67 pmol/l in the control group and 44.16 ± 4.63 pmol/l in the migraine group. However, it was not possible to observe statistical significant differences between patients with migraine and the control group.

In a recent study, the authors measured OT in the CSF of patients with Huntington's disease. They found that OT concentration in the CSF was significantly lower compared to controls in the healthy group and concluded that "the level of OT may represent an objective and comparable measure that could be used as a state biomarker for impairment of social cognition" (67). So, studying the presence of biomolecules in CSF may help the diagnostic, prognostic, and understanding of the physiopathology of neurological diseases.

Studies indicate that OT has a role in suppressing pain in the central nervous system (68), including migraine prevention (39). In addition, OT has widespread effects on mood regulation and behavior (68). Despite the fact that OT in CSF has a half-life of approximately 28 minutes, which is much longer than in blood, which lasts 1 to 2 minutes, no significant differences were identified between CSF OT levels in the present study.

Furthermore, hypothalamic regions that contribute to the onset of migraine are also reported to be sources of OT, with projections throughout the brain, spinal cord, and neurohypophysis (69,70). There are reports that have identified OT receptors expressed in migraine-related areas of the central nervous system, such as the caudal trigeminal nuclei and spinal cord, and in the trigeminal ganglia, suggesting an influence on pain processing and migraine pathophysiology (71,72).

Furthermore, nNOS is present in C fibers that innervate cerebral arteries, thus suggesting a participation in the activation mechanism in migraine(73).

Among the comorbidities related to migraine, depression stands out, corroborating once again with the relationship between the molecules present in neuronal disorders in general and migraine (30). A study (74) that analyzed the CSF NO levels of 14 patients with cluster headache observed that during attacks the NO levels were increased compared to the control group. In this study, no significant differences were demonstrated when comparing the migraine and control groups in terms of NO concentrations.

Few studies have evaluated possible CSF biomarkers in patients with migraine (see Table 1). The results are still conflicting. Migraine is a complex disease with a broad spectrum of severity, from rare headache attacks with mild to moderate intensity to chronic migraine with daily episodes of headache, not to mention the two groups of migraineurs who present with aura and those who never present any attack of migraine

associated with migraine aura. The authors would like to raise the possibility of bias in the case of a study with negative results (without statistical significance). These articles are not published either because the authors do not submit the manuscript for publication because they think the reviewers would not be interested in publishing, or the scientific journals really do not agree to publish such studies. Thus, studies that often do not follow scientific rigor are published because of a statistical difference between the analyzed groups.

It is expected that molecules involved in the mechanisms that lead to migraine are altered in migraine attacks, however, this can be observed in specific regions of the brain, since in CSF the molecules were possibly diluted before reaching the collection site, that is, the lumbar region. Perhaps this explains the absence of difference in CGRP, OT, and NO concentrations in the present study.

Conclusions

The hypothesis that there is a change in CGRP, OT, and NO concentrations in CSF in patients with migraine was tested in the pain-free (interictal) interval; however, the hypothesis was not supported by the data obtained in this study. Nevertheless, based on several findings, the participation of these molecules in the mechanisms of activation of migraine attacks is remarkable. This correlation, therefore, deserves that other studies raise the possibility of the involvement of these molecules in distinct regions of the brain, collaborating with the elucidation of the pathophysiology of migraine; thus being able to contribute to more selective and effective therapeutic strategies that act in a preventive way in crises of migraine.

Ethic Approval and Patient Consent

The work was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco through the protocol CAAE 99301018.0.0000.5208. Participants were informed about all research procedures and signed an informed consent form.

Authors' contribution

Maria Rosana de Souza Ferreira, Henry Martins Soares Fortes, Willianne Emanuelle Rodrigues Costa, José Antunes-Rodrigues: Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;

Maria Rosana de Souza Ferreira, Danyelly Bruneska Gondim Martins, Marcelo Moraes Valença: Drafting the work or revising it critically for important intellectual content;

Marcelo Moraes Valença: Final approval of the version to be published;

Maria Rosana de Souza Ferreira, Marcelo Moraes Valença: Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors declare that they have not received financial support for the research, authorship and/or publication of this article.

Acknowledgment

We thank Prof. Dr. Antunes-Rodrigues, responsible for the Laboratory of Neuroendocrinology, Department of Physiology of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, who made the laboratory available for carrying out part of the experiments in this study. We extend our thanks to Ms. Milene Mantovani, who collaborated with the assay techniques performed in the experiments. We also thank the

anesthesiologist team and its residents for their participation in the collection of CSF samples.

References

1. Tfelt-Hansen P, Le H. Calcitonin gene-related peptide in blood: Is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review. Vol. 10, *Journal of Headache and Pain*. 2009. p. 137–43.
2. Medina S, Bakar NA, O'Daly O, Miller S, Makovac E, Renton T, et al. Regional cerebral blood flow as predictor of response to occipital nerve block in cluster headache. *The Journal of Headache and Pain*. 2021 Dec 12;22(1):91.
3. Loehrer E, Vernooij MW, van der Lugt A, Hofman A, Ikram MA. Migraine and cerebral blood flow in the general population. *Cephalalgia*. 2015 Feb 1;35(2):190–8.
4. Shayestagul NA, Christensen CE, Amin FM, Ashina S, Ashina M. Measurement of Blood Flow Velocity in the Middle Cerebral Artery During Spontaneous Migraine Attacks: A Systematic Review. Vol. 57, *Headache*. Blackwell Publishing Inc.; 2017. p. 852–61.
5. Lee MJ, Chu MK, Choi H, Choi HA, Lee C, Chung CS. Longitudinal changes in cerebral blood flow velocities in different clinical courses of migraine. *Cephalalgia*. 2017 Sep 1;37(10):927–37.
6. Wei DY, O'Daly O, Zelaya FO, Goadsby PJ. Areas of cerebral blood flow changes on arterial spin labelling with the use of symmetric template during nitroglycerin triggered cluster headache attacks. *NeuroImage: Clinical*. 2022 Jan 1;33.
7. Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A, Gallai & v. Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks.
8. Schwedt TJ, Hentz JG, Sahai-Srivastava S, Spare NM, Martin VT, Treppendahl C, et al. Headache characteristics and burden from chronic migraine with medication overuse headache: Cross-sectional observations from the Medication Overuse Treatment Strategy trial. *Headache*. 2021 Feb 1;61(2):351–62.
9. Pellesi L, Al-Karagholi MAM, de Icco R, Chaudhry BA, Lopez CL, Snellman J, et al. Plasma Levels of CGRP During a 2-h Infusion of VIP in Healthy Volunteers and Patients With Migraine: An Exploratory Study. *Frontiers in Neurology*. 2022 Apr 1;13.

10. Ashina S, Bentivegna E, Martelletti P, Eikermann-Haerter K. Structural and Functional Brain Changes in Migraine. Vol. 10, Pain and Therapy. Adis; 2021. p. 211–23.
11. Younis S, Christensen CE, Vestergaard MB, Lindberg U, Tolnai D, Paulson OB, et al. Glutamate levels and perfusion in pons during migraine attacks: A 3T MRI study using proton spectroscopy and arterial spin labeling. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2021 Mar 1;41(3):604–16.
12. Christensen CE, Younis S, Lindberg U, de Koning P, Tolnai D, Paulson OB, et al. Intradural artery dilation during experimentally induced migraine attacks. *Pain*. 2021 Jan 1;162(1):176–83.
13. Wang Y, Pan Q, Tian R, Wen Q, Qin G, Zhang D, et al. Repeated oxytocin prevents central sensitization by regulating synaptic plasticity via oxytocin receptor in a chronic migraine mouse model. *Journal of Headache and Pain*. 2021 Dec 1;22(1).
14. Iljazi A, Ashina H, Zhuang ZA, Lopez Lopez C, Snellman J, Ashina M, et al. Hypersensitivity to calcitonin gene-related peptide in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2021 May 1;41(6):701–10.
15. Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, Kurth T, Ayata C, Charles A, et al. Migraine. *Nature Reviews Disease Primers*. 2022 Dec 13;8(1):2.
16. Fejes E, Feher G, Gurdan Z, Gombos K, Koltai K, Pusch G, et al. Characteristics of Patients Referred To A Specialized Headache Clinic. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1–6.
17. Krymchantowski A v, Tepper SJ, Jevoux C, Valença M. Medication-Overuse Headache: Protocols and Outcomes in 149 Consecutive Patients in a Tertiary Brazilian Headache Center. *Headache [Internet]*. 2017 Jan [cited 2018 Jul 25];57(1):87–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/head.12970>
18. Dodick DW. Migraine. *Endocrinology*. 2018;391(6):1315–30.
19. Le H, Tfelt-Hansen P, Skytthe A, Kyvik KO, Olesen J. Association between migraine, lifestyle and socioeconomic factors: A population-based cross-sectional study. *Journal of Headache and Pain*. 2011 Apr;12(2):157–72.

20. Dogan VB, Dagdeviren H, Dirican A, Dirican AC, Tutar NK, Yayla VA, et al. Hormonal effect on the relationship between migraine and female sexual dysfunction. *Neurological Sciences*. 2017 Sep 1;38(9):1651–5.
21. Sair A, Sair YB, Akyol A, Sevincok L. Affective temperaments and lifetime major depression in female migraine patients. *Women and Health*. 2020 Nov 25;60(10):1218–28.
22. Böttcher B, Kyprianou A, Lechner C, Kößler M, Heinz-Erian E, Neururer S, et al. Manifestation of migraine in adolescents: Does it change in puberty? *European Journal of Paediatric Neurology*. 2020 May 1;26:29–33.
23. Entonen AH, Suominen SB, Korkeila K, Mäntyselkä PT, Sillanmäki LH, Ojanlatva A, et al. Migraine predicts hypertension-a cohort study of the Finnish working-age population. *European Journal of Public Health*. 2014;24(2):244–8.
24. Wang YF, Wang SJ. Hypertension and Migraine: Time to Revisit the Evidence. Vol. 25, *Current Pain and Headache Reports*. Springer; 2021.
25. Pietrini U, de Luca M, de Santis G. Hypertension in headache patients? A clinical study. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2005 Oct;112(4):259–64.
26. Payne TJ, Stetson B, Stevens VM, Johnson CA, Penzien DB, Dorsten B van. The Impact of Cigarette Smoking on Headache Activity in Headache Patients. *Headache*. 1991;31(5):329–32.
27. Aamodt AH, Stovner LJ, Hagen K, Bråthen G, Zwart J. Headache prevalence related to smoking and alcohol use. The Head-HUNT Study. *European Journal of Neurology*. 2006 Nov;13(11):1233–8.
28. Dueland AN. Headache and Alcohol. *Headache*. 2015 Jul 1;55(7):1045–9.
29. Rivera-Mancilla E, Al-Hassany L, Villalón CM, MaassenVanDenBrink A. Metabolic Aspects of Migraine: Association With Obesity and Diabetes Mellitus. *Frontiers in Neurology*. 2021 Jun 9;12.
30. Peres MFP, Mercante JPP, Tobo PR, Kamei H, Bigal ME. Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. *Journal of Headache and Pain*. 2017 Dec 1;18(1).

31. Somasundaram C, Diz DI, Coleman T, Bukoski RD. Adventitial neuronal somata. *Journal of Vascular Research*. 2006;43(3):278–88.
32. Edvinsson L. Role of CGRP in Migraine. 2019; Available from: http://link.springer.com/10.1007/164_2018_201
33. Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt FW, Edvinsson L. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigeminovascular system. *Journal of Pain* [Internet]. 2013;14(11):1289–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.03.010>
34. Iyengar S, Johnson KW, Ossipov MH, Aurora SK. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. Vol. 59, Headache. Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 659–81.
35. Gross EC, Lisicki M, Fischer D, Sándor PS, Schoenen J. The metabolic face of migraine — from pathophysiology to treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2019;15(11):627–43.
36. Kee Z, Kodji X, Brain SD. The role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in neurogenic vasodilation and its cardioprotective effects. *Frontiers in Physiology*. 2018;9(SEP):1–13.
37. Ashina M, Hansen JM, Á Dunga BO, Olesen J. Human models of migraine - short-term pain for long-term gain. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2017 Dec 6 [cited 2018 Jul 25];13(12):713–24. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrneurol.2017.137>
38. Tzabazis A, Kori S, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, et al. Oxytocin and Migraine Headache. *Headache: The Journal of Head and Face Pain* [Internet]. 2017 May [cited 2018 Jul 25];57:64–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28485846>
39. Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Klukinov M, Pascual C, Manering N, et al. Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2018 Jul 25];36(10):943–50. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0333102415618615>

40. Unger JW, Lange W. Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1991;4(4):299–309.
41. Vecsernyés M, Jójárt I, Jójárt J, Laczi F, László FA. Presence of chromatographically identified oxytocin in human sensory ganglia. *Brain Research*. 1987;414(1):153–4.
42. Swanson LW, McKellar S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *Journal of Comparative Neurology*. 1979;188(1):87–106.
43. Bharadwaj VN, Porreca F, Cowan RP, Kori S, Silberstein SD, Yeomans DC. A new hypothesis linking oxytocin to menstrual migraine. Vol. 61, *Headache*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1051–9.
44. Warfvinge K, Krause D, Edvinsson L. The distribution of oxytocin and the oxytocin receptor in rat brain: Relation to regions active in migraine. *Journal of Headache and Pain*. 2020 Feb 7;21(1).
45. BROWN DC, PERKOWSKI S. Oxytocin Content of the Cerebrospinal Fluid of Dogs and Its Relationship to Pain Induced by Spinal Cord Compression. *Veterinary Surgery* . 1998;27(6):607–11.
46. Yang J. Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994;19(8):867–71.
47. Wang YL, Yuan Y, Yang J, Wang CH, Pan YJ, Lu L, et al. The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. *Neuropeptides*. 2013 Apr;47(2):93–7.
48. Gallati V, Alberti A, Gallai B, Coppola F, Floridi A, Sarchielli & P. Glutamate and nitric oxide pathway in chronic daily headache: evidence from cerebrospinal fluid. 2003.
49. Peres MFP, Zukerman E, Senne Soares CA, Alonso EO, Santos BFC, Faulhaber MHW. Cerebrospinal fluid glutamate levels in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2004 Sep;24(9):735–9.

50. Vieira DSDS, Naffah-Mazzacoratti MDG, Zukerman E, Soares CAS, Cavalleiro EA, Peres MFP. Glutamate levels in cerebrospinal fluid and triptans overuse in chronic migraine. *Headache*. 2007 Jun;47(6):842–7.
51. Fonteh AN, Chung R, Sharma TL, Fisher RD, Pogoda JM, Cowan R, et al. Cerebrospinal fluid phospholipase C activity increases in migraine. *Cephalalgia*. 2011 Apr;31(4):456–62.
52. Isobe C, Terayama Y. A remarkable increase in total homocysteine concentrations in the CSF of migraine patients with aura. *Headache*. 2010 Nov;50(10):1561–9.
53. Steinberg A, Wiklund NP, Brundin L, Nilsson Remahl AIM. Levels of nitric oxide metabolites in cerebrospinal fluid in cluster headache. *Cephalalgia*. 2010 Jun;30(6):696–702.
54. Wang YL, Yuan Y, Yang J, Wang CH, Pan YJ, Lu L, et al. The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. *Neuropeptides*. 2013 Apr;47(2):93–7.
55. Bø SH, Davidsen EM, Gulbrandsen P, Dietrichs E, Bovim G, Stovner LJ, et al. Cerebrospinal fluid cytokine levels in migraine, tension-type headache and cervicogenic headache. *Cephalalgia*. 2009 Mar;29(3):365–72.
56. Harrington MG, Fonteh AN, Cowan RP, Perrine K, Pogoda JM, Biringer RG, et al. Cerebrospinal fluid sodium increases in migraine. *Headache*. 2006 Jul;46(7):1128–35.
57. Sarchielli P, Pini LA, Coppola F, Rossi C, Baldi A, Mancini ML, et al. Endocannabinoids in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(6):1384–90.
58. Olesen J. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*. 2018;38(1):1–211.
59. Risch M, Vogler B, Dux M, Messlinger K. CGRP outflow into jugular blood and cerebrospinal fluid and permeance for CGRP of rat dura mater. *Journal of Headache and Pain*. 2021 Dec 1;22(1).

60. Juul R, Hara H, Gisvold SE, Brubakk AO, Fredriksen TA, Waldemar G, et al. :Acta. Nduroch rurglca Alterations in Perivascular Dilatory Neuropeptides (CGRP, SP, VIP) in the External Jugular Vein and in the Cerebrospinal Fluid Following Subarachnoid Haemorrhage in Man. Vol. 132, Acta Neurochir (Wien). 1995.
61. Henry MA, Johnson LR, Nousek-goebl N, Westrum LE. Light Microscopic Localization of Calcitonin Gene-Related Peptide in the Normal Feline Trigeminal System and Following Retrogasserian Rhizotomy. Vol. 365526640, THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY. 1996.
62. Dux M, Will C, Eberhardt M, Fischer MJM, Messlinger K. Stimulation of rat cranial dura mater with potassium chloride causes CGRP release into the cerebrospinal fluid and increases medullary blood flow. *Neuropeptides*. 2017 Aug 1;64:61–8.
63. Iyengar S, Johnson KW, Ossipov MH, Aurora SK. CGRP and the Trigeminal System in Migraine. *Headache*. 2019;59(5):659–81.
64. Melo-Carrillo A, Strassman AM, Nir RR, Schain AJ, Nosedá R, Stratton J, et al. Fremanezumab—a humanized monoclonal anti-cgrp antibody—inhibits thinly myelinated (A δ) but not unmyelinated (c) meningeal nociceptors. *Journal of Neuroscience*. 2017 Nov 1;37(44):10587–96.
65. Goadsby PJ, Edvinsson XL, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Annals of Neurology*. 1988;23(2):193–6.
66. Sarchielli P, Pini LA, Coppola F, Rossi C, Baldi A, Mancini ML, et al. Endocannabinoids in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(6):1384–90.
67. Hellem MNN, Cheong RY, Tonetto S, Vinther-Jensen T, Hendel RK, Larsen IU, et al. Decreased CSF oxytocin relates to measures of social cognitive impairment in Huntington’s disease patients. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2022 Jun;99:23–9.
68. Poisbeau P, Grinevich V, Charlet A. Oxytocin signaling in pain: Cellular, circuit, system, and behavioral levels. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Verlag; 2018. p. 193–211.

69. Warfvinge K, Krause D, Edvinsson L. The distribution of oxytocin and the oxytocin receptor in rat brain: Relation to regions active in migraine. *Journal of Headache and Pain*. 2020 Feb 7;21(1).
70. Warfvinge K, Krause DN, Maddahi A, Grell AS, Edvinsson JCA, Haanes KA, et al. Oxytocin as a regulatory neuropeptide in the trigeminovascular system: Localization, expression and function of oxytocin and oxytocin receptors. *Cephalalgia*. 2020 Oct 1;40(12):1283–95.
71. Krause DN, Warfvinge K, Haanes KA, Edvinsson L. Hormonal influences in migraine — interactions of oestrogen, oxytocin and CGRP. *Nature Reviews Neurology*. 2021 Oct 20;17(10):621–33.
72. Nappi RE, Tiranini L, Sacco S, de Matteis E, de Icco R, Tassorelli C. Role of Estrogens in Menstrual Migraine. *Cells* [Internet]. 2022 Apr 15;11(8):1355. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/8/1355>
73. Saini R, Azam Z, Sapra L, Srivastava RK. Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) in Neutrophils: An Insight. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 49–83.
74. Steinberg A, Wiklund NP, Brundin L, Nilsson Remahl AIM. Levels of nitric oxide metabolites in cerebrospinal fluid in cluster headache. *Cephalalgia*. 2010 Jun;30(6):696–702.

Figures and legends

Table 1: Biomarkers identified in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with migraine or headache.

Figure 1: Article search strategy flowchart.

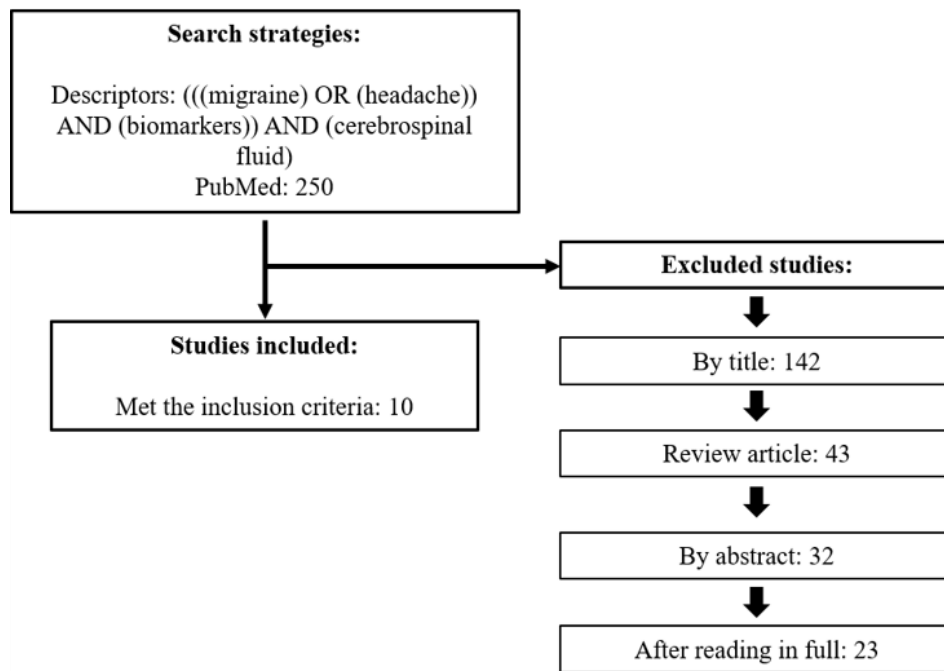
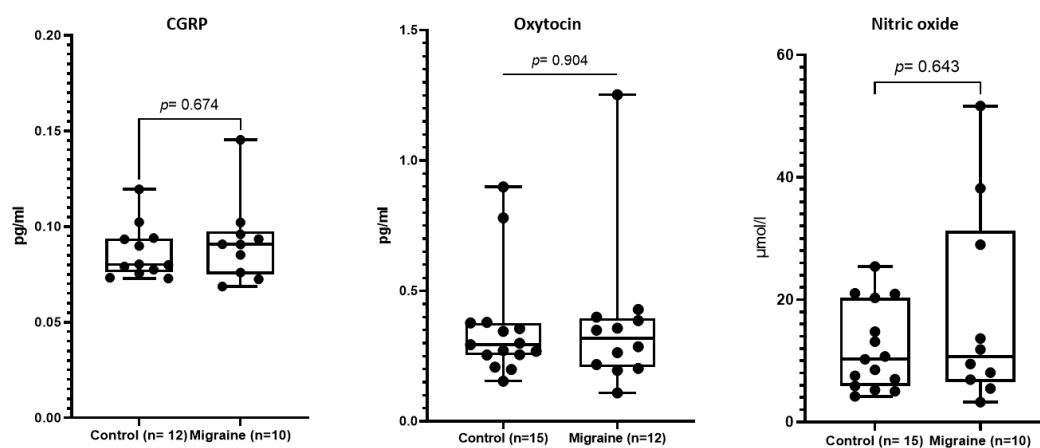


Figure 2: Concentrations of Calcitonin gene-related peptide (CGRP), oxytocin and nitric oxide in the control and migraine groups.



ANEXO A

Parecer de aprovação do comitê de ética

**UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONCENTRAÇÕES DE OCITOCINA, CGRP (CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE) E ÓXIDO NÍTRICO NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO, GÂNGLIO TRIGEMINAL, DURA-MÁTER E SUAS RELAÇÕES COM MIGRÂNEA E

Pesquisador: maria rosana de souza ferreira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 99301018.0.3001.8807

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSEH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.057.815

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de Pesquisa de Doutorado, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, de autoria da doutoranda Maria Rosana de Souza Ferreira, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença e co-orientação da Profa. Dra. Danyelly Brunheska Gondim Martins. Para esta pesquisa, serão convidadas a participar da pesquisa mulheres que estiverem internadas no Hospital das Clínicas da UFPE, e no período pré-operatório para cirurgias eletivas, com idade variando de 20 a 50 anos e eutróficas. A mesma será realizada em três etapas: - Primeira etapa (avaliação clínica): onde todas as participantes responderão a questionários referentes à classificação do tipo de cefaleia, critérios de classificação da fibromialgia, depressão e ansiedade, estresse, fadiga, alterações do sono. Além, disso, serão submetidas à avaliação dos pontos dolorosos e avaliação de alodinia. - Segunda etapa (coleta de material): durante o procedimento de apresentados os critérios de classificação para caracterização da amostra, estabelecendo um número de 128 participantes. Os critérios de inclusão e exclusão foram descritos. naqui anestesia, será coletado 1-2 ml de LCR.- Terceira etapa (análise das substâncias): análise da concentração das substâncias. Após a aplicação dos instrumentos de coleta as mulheres serão alocadas em quatro grupos distintos, conforme apresentação clínica. A pesquisa também pretende estudar cadáveres necropsiados no Serviço de Verificação de Óbitos, os quais, segundo relatos familiares, em vida apresentavam histórico de

Endereço: Av. Professor Moraes Rêgo, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermaria)

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-901

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-3743

E-mail: cephoufpe@gmail.com