



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Asociación de los polimorfismos rs1051730 del gen  
*CHRNA3* y rs1044396 del gen *CHRNA4* en pacientes  
con trastorno bipolar y dependencia a la nicotina**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A:**

**Luis Antonio Rodríguez Sibrian**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Alma Delia Genis Mendoza**

**2017**

**Ciudad Universitaria, CDMX**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Rodríguez

Sibrian

Luis Antonio

2282027544

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412011854

2. Datos del tutor

Dra

Genis

Mendoza

Alma Delia

3. Datos del sinodal 1

Dr

Valdés

López

Víctor Manuel

4. Datos del sinodal 2

Dr

Camacho

Carranza

Rafael

5. Datos del sinodal 3

M en C

Scheinvar

Gottdiener

Enrique

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Rivas

Martínez

Hugo

7. Datos del trabajo escrito

Asociación de los polimorfismos rs1051730 del gen *CHRNA3* y rs1044396 del gen *CHRNA4* en pacientes con trastorno bipolar y dependencia a la nicotina

93

2017

## **Dedicatorias**

Este trabajo es dedicado a mis padres, mi núcleo principal, este trabajo es suyo, no podría imaginar haber nacido en otra familia, ustedes siempre me enseñaron amor y comprensión, a pesar de que en momentos pude haberles sacado canas de colores. Nunca me han dejado solo y por ustedes he llegado a comprender lo que es el sacrificio por nuestros seres amados. Sus historias de vida me han inspirado y hasta ahora en esta etapa de mi vida he llegado a comprender y agradecer tantas cosas que son excedentes de mención.

A lo largo de mi historia ha habido momentos en los que las circunstancias me han hecho querer desistir y aun cuando he fallado y caído, me han mostrado lo que son las segundas oportunidades y levantarse con raíces más fuertes. Gran parte de mi pasión por la ciencia la adquirí al crecer con ustedes, desde que tengo uso de razón estuve rodeado de paisajes y naturaleza, me enseñaron a cuidarla, respetarla y sobre todo a admirarla. Ahí fue cuando nació mi pasión, justo en la curiosidad por comprender esas maravillas.

A mi padre José Luis Rodríguez García, por inculcarme siempre rectitud, orden y fortaleza. Siempre has luchado por nosotros, nuestra familia, eres un hombre valiente, inteligente y con un corazón inmenso, gracias por el amor que siempre me has brindado. Y no solo eso, también por estar conmigo en los momentos de aventuras y travesuras, como esa vez en las lomas cuando terminamos mojados de pies a cabeza. Por las historias antes de dormir, por las noches de campamento a la luz del fuego y las estrellas, pero más que nada por ser mi amigo, y hacerle ver a mi yo pequeño lo maravilloso que es divertirse con lo más simple y maravilloso que es el mundo que nos rodea. Y por hacerle ver a mi yo de estos días que la dedicación y la voluntad son más fuertes que cualquier cosa.

A mi madre Maura Brillit Sibrian Zelada, por llenarme de amor, por procurar siempre mi felicidad a pesar de que esto en ocasiones ha ido en contra de tus ideologías, me has enseñado a mantener la mente abierta, me has enseñado el amor propio y el amor incondicional, eres una mujer muy fuerte, muy tierna y de mente abierta.

Gracias por escucharme, por amarme con cada una de mis imperfecciones. Me has enseñado a no dejarme derrotar, aun cuando sentimos que nos derrumbamos. Gracias por compartir tus historias de vida conmigo, por ayudarme a alzar la frente las veces que me he caído.

Estas palabras son poco para decir todo lo que siento al recordar los momentos en que ambos han estado apoyándome incondicionalmente. Ustedes son mi más grande bendición y mis pilares más fuertes. Agradezco mucho a sus historias de vida y por ser mis padres, mis amigos, consejeros, etc. Los amo inmensamente.

## Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer al Dr. Humberto Nicolini por abrirme las puertas del laboratorio de genómica de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, por compartirme herramientas y conocimiento que me apoyaron a culminar este proceso. A la Dra. Alma Delia Genis por ser mi tutora, por tener paciencia y comprensión, por apoyarme y respaldarme las veces que me he equivocado. Asimismo quiero agradecer a cada uno de mis camaradas y miembros del laboratorio, los que estuvieron de paso y los que me acompañaron al final de este proceso, por compartir sus experiencias, conocimientos, momentos de risa y diversión.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias, por recibirme en sus aulas, brindarme el ambiente idóneo para mi crecimiento intelectual y profesional, al darme profesores excelentes que me apoyaron en múltiples aspectos. Porque en sus filas conocí a personas extraordinarias de las cuales algunas se volvieron mis amigos y parte de mi vida, me han recibido con apoyo y comprensión en este nuevo ambiente que conocía.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica, por ser la fuente de este proyecto y darme herramientas para descubrir este maravilloso campo que es la medicina genómica.

A mis sinodales por apoyarme a enriquecer este trabajo. A mis profesores que sentaron las bases en mis escuelas de mi ciudad natal, mis profesores del Colegio Preparatorio de Xalapa, y de mis escuelas anteriores, a quienes recuerdo con mucho cariño y admiración.

A mi familia por ser parte de mi historia, por ser parte de mi crecimiento e inspiración. A mis primos porque con ustedes viví aventuras muy hermosas y travesuras también, en especial a mis primos Alexis por toda la confianza que nos tenemos, por ser mi mejor amigo en los momentos que más lo he necesitado, por tus consejos y Alongiv por todos los momentos que compartimos por las locuras y el cariño, con ustedes crecí y he vivido de todo, de los mejores momentos de mi vida han sido a su lado. A mi hermana Naira por ser fuente de inspiración y enseñarme fortaleza.

Y por último quiero agradecer a mi familia aquella que nació en un hogar diferente, pero que al transcurrir nuestros días el destino nos puso en el mismo camino, con el tiempo nuestra confianza fue creciendo y nos volvimos cada vez más cercanos, hasta el punto en el que los he dejado de considerar mis amigos y ahora son parte de mi familia. Siempre he sabido que no soy de muchos amigos, pero tengo a los mejores, literal me han conocido en todos mis momentos, en mi crecimiento, a muchos de ustedes los conozco desde hace media vida y algunos más desde que mi camino me trajo a esta ciudad. Quiero que sepan que sin su apoyo y su compañía mi vida sería muy monótona, gracias por enriquecerme con todos sus matices, por aguantarme, cuidarme, ser fuente de luz y por ser como son. Con ustedes puedo ser yo mismo sin tabúes y con ustedes he pasado las más grandes insensateces, locuras, momentos difíciles, aventuras y lo mejor es que juntos hemos crecido y hemos caminado lado a lado porque como dicen “A lo largo de nuestra búsqueda el camino se ha hecho soportable porque nos tenemos los unos a los otros”.

## Índice

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
Nicotina y tabaquismo	6
<b>Marco teórico</b>	<b>7</b>
Epidemiología	7
Fisiología	9
Neurotransmisión	10
Trastorno Bipolar y tabaquismo	12
Bases genéticas de la dependencia a la nicotina	14
Fundamento y diseño de los estudios de asociación genética	16
Receptores nicotínicos de acetilcolina	21
Descripción genómica	25
Gen <i>CHRNA3</i> : Receptor Nicotínico Colinérgico $\alpha$ -3	26
SNP: rs 1051730	28
Gen <i>CHRNA4</i> : Receptor Nicotínico Colinérgico $\alpha$ -4	30
SNP: rs 1044396	31
<b>Justificación</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos generales</b>	<b>35</b>
Objetivos particulares	35
<b>Hipótesis</b>	<b>36</b>
<b>Metodología</b>	<b>37</b>
Obtención de las muestras de sangre	37
Procesamiento de las muestras	38
Genotipificación	40
Análisis estadístico	45
Diferenciación entre fenotipos y características de las muestras.	45
Análisis genético	46
<b>Resultados</b>	<b>48</b>
Epidemiología	48

Genotipificación _____	51
_____	55
Estudio de asociación genética _____	55
Correlación con variables sociodemográficas _____	57
<b>Discusión.</b> _____	<b>60</b>
<b>Conclusiones</b> _____	<b>67</b>
Limitaciones: _____	68
<b>Referencias</b> _____	<b>69</b>
<b>Anexos</b> _____	<b>80</b>

## Resumen

El tabaquismo es un grave problema de salud actual, se estima que afecta a mil millones de personas en el mundo, según la OMS es factor de riesgo para 6 de las 10 principales causas de muerte en el mundo, aunado a esto datos estadísticos muestran que gran porcentaje de los pacientes psiquiátricos presentan dependencia a la nicotina, de los cuales los pacientes con trastorno bipolar son los que muestran mayor porcentaje de dependencia.

La etiología del fenotipo de dependencia a la nicotina es multifactorial, sin embargo Múltiples estudios respaldan que la etiología de la dependencia a la nicotina está relacionada a factores genéticos. Los receptores nicotínicos de acetilcolina son el blanco principal de la nicotina en el sistema nervioso central y son altamente expresados en circuitos neuronales del sistema límbico ya que participan en el proceso de reforzamiento de la adicción. Asimismo se sabe que los receptores nicotínicos son hetero pentámeros constituidos por subunidades alfa (blanco de unión a la nicotina) y subunidades beta. Dentro de la literatura se han asociado a polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de las subunidades alfa-3 y alfa-4 con la dependencia a la nicotina, al cáncer de pulmón y a procesos cognitivos.

En este estudio se evaluó la relación que guardan polimorfismos de los genes codificantes para la subunidad alfa-3 y alfa-4 de los receptores nicotínicos colinérgicos neuronales (*nAChR*) con la dependencia a la nicotina. En particular se analizaron 2 polimorfismos de dichos receptores (uno del gen *CHRNA3*: rs1051730 y otro del gen *CHRNA4*: rs1044396) mediante un estudio casos-controles en población mexicana proveniente del Centro-Golfo de la república Mexicana, para lo cual se compararon dos tipos de pacientes; unos con trastorno bipolar y dependencia a la nicotina y otros únicamente con dependencia a la nicotina. El nivel de dependencia fue evaluado mediante el test de fagerström y los pacientes con trastorno bipolar fueron diagnosticados mediante los criterios del DSM-IV.

Además se realizó una base de datos con variantes sociodemográficas y antecedentes heredo-familiares, para conocer la relación entre el nivel de dependencia a la nicotina con diferentes variantes.

El estudio de asociación fue analizado con el software online “DeFinetti” y “SNPStats” se encontró asociación estadística para el SNP *rs1051730*, donde el alelo T probablemente sea protector al desarrollo de dependencia bajo el modelo de herencia dominante. Posteriormente se ajustó el modelo con variantes sociodemográficas mediante el software “SNPStats” y “STATA 11”; se determinó una probable asociación entre el alelo T, asimismo tal alelo mostró un efecto protector dominante en mujeres que cuentan con el alelo; sin embargo en hombres los mismos genotipos con al menos una copia del alelo T mostraron un efecto de riesgo, debido a que es probable que una vez que se vuelven adictos son propensos a consumir más nicotina para obtener los efectos fisiológicos regulares.

## Abreviaturas

- ATV: Área tegmental ventral
- CD: Corteza prefrontal
- *CHRNA3*: receptor nicotínico colinérgico alfa-3
- *CHRNA4*: receptor nicotínico colinérgico alfa-4
- DN: Dependencia a la nicotina
- DSM-V: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales V
- ENA: encuesta nacional de adicciones
- FG: Frecuencias genotípicas
- GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GWAS: estudio de asociación de genoma completo (Genome-Wide Association Study)
- nAChR: receptor nicotínico colinérgico
- NA: Núcleo Acumbens
- ND: Nivel de dependencia
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: Odds Ratio
- PCR-RT: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Polymerase chain reaction- Real Time)
- SNP's: polimorfismos de nucleótido simple (Single Nucleotide Polimorfism)
- TB: Trastorno bipolar
- T.F: test de fagerström

## Introducción

### Nicotina y tabaquismo

El tabaquismo se ha convertido en un grave problema de salud. Según la organización mundial de la salud (OMS) afecta aproximadamente a la mitad de sus consumidores; se estima que anualmente mueren 6 millones de consumidores en el mundo a causa del tabaco, ya sea de manera directa o indirecta. Los productos del tabaco son aquellos que están hechos total o parcialmente con tabaco, sean para fumar, chupar, masticar o esnifar. Todos contienen nicotina, un ingrediente psicoactivo muy adictivo. Según la OMS casi el 80% de los mil millones de fumadores en el mundo viven en países de ingresos bajos o medios, lo que es explicable debido a que son pocas las personas que comprenden los riesgos que entraña el uso del tabaco (OMS, tabaco, nota descriptiva n° 339, 2014).

Las consecuencias del consumo del tabaco no sólo se limitan al fumador, cualquier persona expuesta al humo del tabaco tiene más riesgos de sufrir enfermedades coronarias y cáncer de pulmón (INEGI, Estadísticas a propósito del día mundial sin tabaco, datos nacionales. 2013). El consumo del tabaco es un importante factor de riesgo para la salud, los consumidores padecen 6 de las 10 principales causas de defunción en el mundo como: cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, enfermedad pulmonar obstructiva, infecciones en vías respiratorias inferiores, cánceres: en pulmón, tráquea y bronquios, cardiopatía hipertensiva (OMS, Nota descriptiva n° 310, 2014). Además se ha visto que existe fuerte asociación entre el consumo de tabaco y los trastornos psiquiátricos (Toro G. *et al.* 2010). En torno a esto un estudio reciente en población sueca realizado mediante modelos de riesgo proporcional de Cox, los cuales consisten en medir el riesgo de algún evento en función del tiempo y de diferentes variables, se observó que tasas altas de consumo de tabaco podrían ser predictoras del desarrollo esquizofrenia en personas de ambos sexos y que además el mismo nivel de consumo de tabaco podría ser predictor para la aparición de síntomas psicóticos (Kendler Kenneth S. *et al.* 2015). La base en torno a tales aseveraciones está fundada en que la nicotina es la

principal sustancia psicoactiva del tabaco y participa en muchos procesos a nivel neurobiológico (Fowler y Kenny 2014) de lo cual se hablará con mayor detalle más adelante.

## **Marco teórico**

### **Epidemiología**

Primero se describían datos sociodemográficos en torno a la problemática del tabaquismo. Datos estadísticos de última encuesta nacional de adicciones en población mexicana indican que para el año 2011 una de las principales causas de muerte fueron las enfermedades isquémicas del corazón, donde el consumo de tabaco funge como importante factor de riesgo. Aunado a esto señalan que la prevalencia de consumo activo de cigarro fue de 21.7% que corresponde a 17.3 millones de fumadores en el país; en general en la población el 31.4% de los hombres y el 12.6% de las mujeres fuman, asimismo la edad promedio de inicio de consumo es de 20.4 años para población en general, de 20 años para hombres y de 21.7 años para mujeres, aunque casi la mitad de los fumadores iniciaron el consumo a los 16 años. La prevalencia de exposición al humo de tabaco ambiental es de 30.2%, en cifras numéricas, este dato indica que 12.5 millones de mexicanos que nunca han fumado se encuentran expuestos al humo de tabaco ambiental (Secretaría de Salud México, Encuesta Nacional de Adicciones 2011).

Aunado a esto, según el atlas de tabaco México es uno de los países donde más se consume tabaco por parte de los jóvenes, el 15.8 % en varones y 12.9 % en mujeres. Así mismo señala que los costos del tabaco son muy accesibles, lo que posibilita su fácil acceso para gran parte de la población, y para apoyar este argumento dentro de los datos del atlas de tabaco existe un apartado correspondiente a la encuesta nacional de ingreso y gastos de los hogares (ENIGH) en la cual se reporta que hogares de menor ingreso (dentro del decil 1) son los que gastan más en tabaco (World lung foundation, The tobacco atlas 2015). Por otro lado, estudios en México señalan que el consumo de tabaco es menor, entre mayor sea

la escolaridad de los individuos (Secretaría de Salud, programa de acción: adicciones, tabaquismo, 2001).

El consumo de tabaco a edades tempranas es multifactorial, para los jóvenes implica una conducta adulta, agradable y de moda, comparaciones convergen que entre más alta sea la edad de inicio de consumo, es menos probable que la persona se convierta en fumador permanente (Soto y García, 2009).

Entre los factores más importantes que contribuyeron al consumo temprano del tabaco se encuentran, el que parientes del núcleo familiar, ya sean padres o hermanos, lo consuman (Kuri *et al.* 2004).

Por otro lado en un estudio realizado en Estados Unidos en el cual se evaluaron diferentes aspectos concernientes al uso de tabaco en jóvenes de diferentes grupos étnicos (blancos, hispanos, afroamericanos y nativos americanos) con trastornos mentales señala que los jóvenes identificaron a la “observación” como un factor de influencia al uso de tabaco, mayormente por parte de la familia; además los medios y la tecnología son otro factor culpable en promover el uso de tabaco (Morris *et al.* 2011).

En cuanto la cesación de consumo de tabaco se ha reportado que 58.4% del total de los fumadores ha intentado dejar de fumar; de las personas que han intentado dejar de fumar 57.2% lo han hecho súbitamente, o disminuyendo gradualmente el número de cigarros (17.6%). Un porcentaje menor dejó de comprar cigarros (14%); ha sustituido fumar por otras actividades (4.2%) o se ha sometido a un tratamiento (2%), el 79.6% de los participantes ha escuchado hablar de medicamentos para dejar de fumar. Del total de los entrevistados el 26.4% son ex fumadores, de los cuales el 34.3% refiere que la razón principal para dejar de fumar, fue por conciencia del daño a su salud (Secretaría de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones 2011).

## **Fisiología**

La adicción a la nicotina es un desorden cónico del cerebro caracterizado por el uso compulsivo y pérdida del control del consumo del tabaco a pesar de sus efectos dañinos. Se caracteriza por la aparición de síntomas de retirada tras el cese de consumo, y recaída después de periodos de abstinencia, la mayor parte de estos efectos son debido a la nicotina (Berrendero *et al.* 2010).

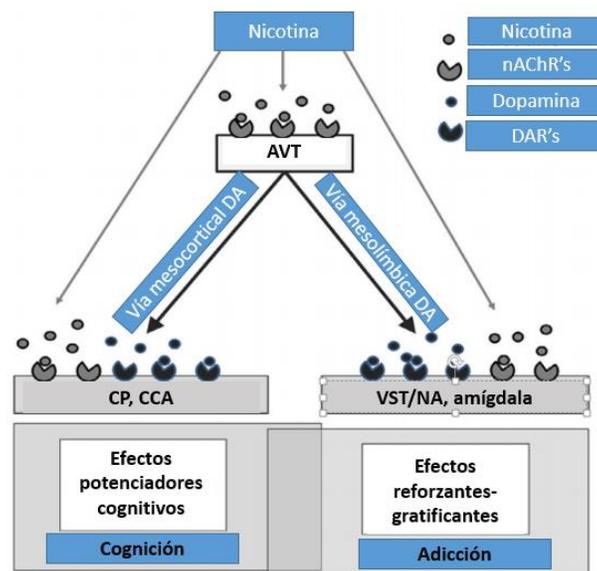
La nicotina es un alcaloide, se encuentra en una proporción del 90-95 % con respecto al total de alcaloides de toda la planta de tabaco, se sintetiza en las raíces, sin embargo es transportada a las hojas (las cuales son el blanco de comercialización para el consumo humano) en donde se almacena dentro de vacuolas (Wang Bingwu *et al.* 2015).

Al fumar, la nicotina se destila por la combustión del cigarrillo y es acarreada por las gotas de alquitrán mientras estas son inhaladas, su absorción por las membranas biológicas depende del pH. Cuando el humo del cigarro alcanza las vías aéreas pequeñas y los alveolos pulmonares, la nicotina es rápidamente absorbida, seguido a esto, la concentración sanguínea crece rápidamente durante la fumada y alcanza un pico al termino de fumar, después se distribuye ampliamente por los diferentes tejidos del cuerpo, los tejidos con mayor afinidad son: el hígado, riñones, bazo, pulmones y tejidos cerebrales. Grandes cantidades de nicotina llegan al cerebro entre 10-20 segundos tras la inhalación (Benowitz Neal L *et al.* 2009).

Existen variaciones personales en la cantidad de nicotina absorbida y están sesgadas por las diferencias entre los modos de fumar (profundidad, duración de la inhalación, número de inhalaciones por cigarrillo, presión de la bocanada, marca del cigarrillo, el que los cigarrillos posean un filtro o no, etc.), se ha calculado que, cada cigarrillo en promedio contiene de 6 a 11 mg de nicotina y al fumador solo le llegan al torrente sanguíneo de 1 a 3 mg (Sansores H. Raúl *et al.* 2002).

## Neurotransmisión

La nicotina al entrar en contacto con el tejido nervioso interactúa con los receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR's), que a su vez están involucradas en muchas vías de las que se hablará con mayor profundidad a continuación. Como se puede ver en la figura 1, dos de los circuitos neuronales que desencadena el contacto con la nicotina son el del proceso adictivo y el del proceso cognitivo, debido a que al igual que otras recompensas naturales activa de manera directa o indirecta el área tegmental ventral (AVT) que a su vez provoca liberación de dopamina (Corominas M. *et al.* 2007). Estudios han encontrado que la administración de antagonistas para los nAChR, la delección de acetilcolina endógena ó disrupción de los genes codificantes para los receptores nicotínicos provocan decremento en la liberación de dopamina (Zhou *et al.* 2001).



**Figura 1:** Circuitos neuronales implicados en los procesos cognitivos y adictivos en respuesta a la nicotina.

Abreviaciones: AVT (área tegmental ventral), nAChR's (receptores nicotínicos de acetilcolina), DA (dopaminérgica), DAR's (receptores dopaminérgicos), CP (corteza prefrontal), CCA (córtex cingulado anterior, VST (estriado ventral), NA (Núcleo accumbens).

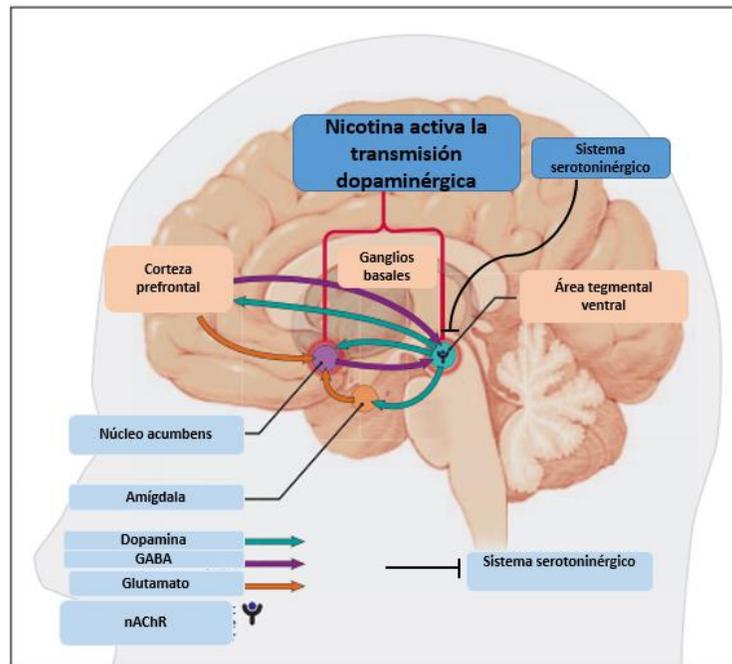
Tomada y modificada de Jasinska *et al.* 2014.

A diferencia de las recompensas naturales que una vez consumidas provocan efecto de saciedad debido a la disminución de la liberación de dopamina, la nicotina aumenta la liberación de dopamina efecto denominado sensibilización dopaminérgica (Corominas M. *et al.* 2007).

La vía mesolímbica como se vio arriba es el principal componente del proceso adictivo, está compuesta por neuronas del sistema dopaminérgico que se componen de cuerpos celulares que se encuentran en el ATV cuyos axones se proyectan al NA y la amígdala (figura 2) (Pérez *et al.* 2015) una vez que la nicotina activa la liberación de nicotina en el ATV se produce un efecto cascada de liberación de dopamina en las áreas a las cuales se conecta. Además se ha reportado que regula el alza de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en NA y en la amígdala (Corominas M. *et al.* 2007). Aparte de las áreas antes mencionadas se ha visto que el sistema dopaminérgico tiene proyecciones a CP, hipocampo y otras áreas del sistema límbico (figura 2) (Kolb *et al.* 2006).

En paralelo a la hiperactividad dopaminérgica, se ha documentado liberación de serotonina en la fase aguda de consumo de nicotina que también ha sido relacionada con recompensa en el NA (Pérez *et al.* 2015) además se ha visto que la administración de agonistas del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub> reduce la administración intravenosa de nicotina en ratas inhibiendo el efecto en el ATV. Aunado a esto la nicotina también influye en la amígdala y el hipocampo mediante neuronas glutamatérgicas ya que la liberación de dopamina inducida por la nicotina puede ser bloqueada por la administración sistemática de antagonistas de los receptores NMDA y AMPA (Liechti *et al.* 2008); y por neuronas y GABAérgicas, se ha visto que la administración de agonistas del receptor GABA-B así como sus moduladores alostéricos positivos decrementan la autoadministración de nicotina en ratas y además la exposición prolongada a efectos de hiperactividad dopaminérgica desensibiliza el sistema GABAérgico lo que provoca el uso compulsivo de la nicotina debido a que el neurotransmisor GABA media el impulso a buscar sustancias (figura 2) (Jiménez Ruiz C.A. *et al.* 2008 y Zieher *et al.* 2005). El consumo crónico de nicotina lleva a una neuroadaptación, con el consecuente aumento de la ansiedad, irritabilidad, depresión, fatiga y dificultades para la

concentración si se detiene el consumo (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012). Los circuitos antes mencionados se describen en la siguiente figura.



**Figura 2:** Corte transversal de encéfalo. Vías neuronales activadas tras la interacción de la nicotina con los nAChR's del AVT.

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

Tomada y modificada de Le Foll *et al.* 2007.

## Trastorno Bipolar y tabaquismo

Según el Manual Diagnóstico y estadístico de trastornos mentales (DSM-V™) el trastorno bipolar (TB) es un trastorno afectivo o del estado de ánimo que comprende periodos de ánimo eufórico y episodios de depresión, es una enfermedad de curso crónico que se representa de manera cíclica y con remisiones episódicas (American Psychiatric Association, 2014).

Se ha visto que en población con enfermedades psiquiátricas procedentes de Canadá, la tasa de uso del cigarrillo es de 2-4 veces más alta que en población en general; existen factores tanto psicológicos y neurobiológicos que contribuyen al desarrollo de tal fenotipo, uno de los factores psicosociales más importantes es el

estrés; el cigarro también puede ser usado para mitigar síntomas clínicos como depresión y disforia, así como para efectos secundarios de la medicación y para solucionar déficits cognitivos que acompañan a la enfermedad psiquiátrica (Lising Enriquez, 2009).

El uso de tabaco representa un importante factor de riesgo que afecta a personas con trastornos mentales, dichos individuos mueren aproximadamente 25 años antes (Morris *et al.* 2011) comparados con la población consumidora de tabaco sin trastornos mentales, cuya esperanza de vida es al menos 10 años menor, esto derivado de enfermedades relacionadas con el uso de tabaco (Jha P *et al.* 2013).

En cuanto a la comorbilidad entre el trastorno bipolar y trastornos por el uso de sustancias es compleja debido a que cada trastorno influye en el otro, son frecuentes las comorbilidades múltiples, por lo cual pacientes con trastorno bipolar y con abuso de sustancias tienen pobre respuesta al tratamiento y evolución clínica (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012).

Existen pocos estudios científicos entre el trastorno bipolar y el tabaquismo, sin embargo se sabe que la nicotina tiene acción sobre diferentes sistemas neuronales, entre las respuestas provocadas se sabe que disminuye los síntomas psicóticos como la depresión; esto mediante receptores nicotínicos presinápticos de las neuronas noradrenérgicas que median los efectos gratificantes en los sistemas de recompensa mesolímbico y amigdalino (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012).

Dentro de las capacidades que se ha visto son afectadas en pacientes con TB son el trabajo de memoria y la atención (Maletic *et al.* 2014). Los nAChR son expresados en interneuronas GABAérgicas en la CP, lo que indica que podrían participar en neurotransmisión excitadora rápida y regular, mediante la liberación de neurotransmisores tales como el glutamato y el GABA. Se sabe que la corteza prefrontal está involucrada en el trabajo de memoria y plasticidad de sinapsis excitatorias, la inervación colinérgica de la CP a núcleos proscencefálicos podría afectar microcircuitos dentro de la CP por medio de la activación de nAChR lo que a su vez podría potenciar el trabajo de memoria y la atención (McGehee. 2007) capacidades que se ven afectadas en el TB.

## **Bases genéticas de la dependencia a la nicotina**

Aunque se ha visto que la etiología de la dependencia a la nicotina es multifactorial, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos desde los años 50's en los que se ha visto la heredabilidad de la dependencia a la nicotina basándose en estudios de familias, adopción, gemelos monocigóticos y dicigóticos, en diferentes poblaciones de ancestría principalmente europea (Sullivan *et al.* 1999) la mayor parte de los estudios antes mencionados donde se han enfocado en la iniciación de la dependencia se ha visto que las causas se deben a factores genéticos y dentro de las tasas de heredabilidad se han encontrado del 40 a 56% (Kaprio. 2009).

A partir de estos resultados, en los últimos años múltiples estudios se han enfocado en la detección de loci específicos que causan susceptibilidad al desarrollo de dependencia a la nicotina. De los cuales, los más grandes se denominan estudios de asociación de genoma completo (GWAS: Genome-wide association study, por sus siglas en inglés) gran cantidad de ellos respaldan que existe predisposición genética asociada a desarrollar dependencia la cual está ligada a múltiples genes (tabla 1).

Dentro de los grupos de genes mayormente asociados con dependencia a la nicotina se encuentran los codificas para subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina (tabla 1). Sumado a esto, la base de datos de Centro de Estudios Genéticos perteneciente al Instituto Nacional de Abuso de Drogas de Estados Unidos, posee una base de datos con 348 genes, que han sido asociados con dependencia a la nicotina en poblaciones Estadounidenses con ancestría europea, entre los genes enlistados se encuentran los codificantes para las subunidades  $\alpha 1$  –  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$  del receptor nicotínico neuronal (Nicotine Dependence Consortium, 2007). Por tal motivo SNP's codificantes para receptores nicotínicos son un blanco potencial para el diseño de estudios de asociación genética.

<b>Estudio</b>	<b>Tipo</b>	<b>Población</b>	<b>Resultados asociación</b>
Bierut <i>et al.</i> 2007	GWAS	Estados Unidos con ancestría europea	Inicio de dependencia a la nicotina: <i>NRXN1</i> , <i>CHRB3</i>
Thorgeirsson <i>et al.</i> 2008	GWAS	Islandia, España y Países Bajos	Dependencia: <i>CHRNA3</i> rs 1051730 y <i>CHRNA5</i> rs16969968
The Tobacco and Genetics consortium 2010	Metaanálisis GWAS	Ancestría europea	# Cigarrillos por día: <i>CHRNA3</i> rs 1051730, <i>SEC13</i> rs 1329650 y rs1028936, <i>EGLN2</i> rs3733829. Inicio de consumo: <i>BDNF</i> rs 6265 Dejar de fumar: rs3025343 cerca del gen <i>DBH</i>
David <i>et al.</i> 2012	Metaanálisis GWAS	Ancestría afroamericana	# Cigarrillos por día: <i>CHRNA5</i> rs2036527
Argos <i>et al.</i> 2014	GWAS	Bangladesh	Inicio de consumo en hombres: SNP's cercanos* a <i>SLC39A11</i> , <i>MIR1305</i>    <i>TENM3</i> , <i>LINC00607</i> , <i>MAT2B</i>    <i>LOC100419716</i> y en el clúster <i>CHRNA5/3</i> . Dependencia en mujeres: SNP's cercanos* a <i>PAGE3</i>    <i>MAGEH1</i> , <i>SLCO3A1</i>    <i>ST8SIA2</i> , <i>MIR4536-1</i> , <i>RRAGB</i>    <i>LOC644924</i> , <i>USP51</i> , <i>XAGE-4</i> , <i>SLCO3A1</i>    <i>ST8SIA2</i> , <i>XAGE-4</i>    <i>RRAGB</i> , <i>RRAGB</i>    <i>LOC644924</i> y en el clúster <i>CHRNA5/3</i> .
Hancock <i>et al.</i> 2015	Metaanálisis GWAS	Ancestría europea	<i>CHRNA4</i> rs2273500

**Tabla 1:** Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) recientes, enfocados en la búsqueda de loci asociados con dependencia a la nicotina en diferentes poblaciones.

*NRXN1*: Neuroxina 1, *CHRB3*: Receptor Nicotínico Colinérgico  $\beta$ -3, *CHRNA3*: Receptor Nicotínico Colinérgico  $\alpha$ -3, *CHRNA5*: Receptor Nicotínico Colinérgico  $\alpha$ -5, *SEC13*: proteína SEC13 (constituyente del retículo endoplásmico y del complejo del poro nuclear), *EGLN2*: Factor Inducible de Hipoxia de la Familia Egl-9 2, *BDNF*: Factor neurotrófico derivado del cerebro, SNP's cercanos\*: diferentes SNP's asociados con DN encontrados en regiones intergénicas cercanas a genes listados en la tabla.

Los GWAS son de gran apoyo para la identificación de genes asociados con enfermedad, sin embargo no parten de hipótesis iniciales acerca de genes ó variantes génicas que estén relacionados a las vías que subyacen a la enfermedad (National Library of Medicine 2017), a diferencia de esto los estudios de asociación genética se basan en hipótesis sobre genes posiblemente causales (National Library of Medicine 2017). Con el fin de conocer la estructura de los estudios de asociación genética a continuación se describen sus características.

### **Fundamento y diseño de los estudios de asociación genética**

Los estudios de asociación genética comprenden un esfuerzo para identificar y caracterizar variantes genómicas que pueden causar susceptibilidad al desarrollo de enfermedades multifactoriales. El objetivo consiste en probar si existe asociación entre la variación genómica en uno o más sitios y la variación fenotípica, generalmente representada por la presencia o ausencia de una enfermedad o por niveles de una enfermedad o rasgo (Hattersley *et al.* 2005) . Las variantes génicas a estudiar se denominan polimorfismos, los más comunes son los polimorfismos de nucleótido simple (Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés) y como su nombre lo dice son cambios en el nucleótido de un alelo.

Un alelo puede ser considerado polimórfico si su frecuencia es  $>1\%$  dentro de la población (Lewin 2008) los SNP's se encuentran una vez cada  $\sim 300$  pares de bases en promedio por lo que existen cerca de 10 millones de ellos en el genoma humano (National Library of Medicine 2017) pueden encontrarse en exones y provocar cambio en el aminoácido codificado, o ser silenciosos, además pueden caer en secuencias de intrones, regiones intergénicas o en secuencias promotoras, en tales casos pueden estar relacionados con la expresión génica. Otra clase de polimorfismos presentes dentro del genoma son son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (VNTR, variable number tandem repeat, por sus siglas en inglés), y también existen variaciones en el número de copias (CNV, copy number variation) (Iniesta *et al.* 2015). Estas dos últimas variaciones surgen debido a deleciones o inserciones, pueden ser pequeños en el caso de

VNTR's o tan grandes para incluir genes completos en el caso de CNV's, ambas pueden influenciar en la actividad de los genes y ultimadamente afectar múltiples funciones corporales (National Library of Medicine 2017).

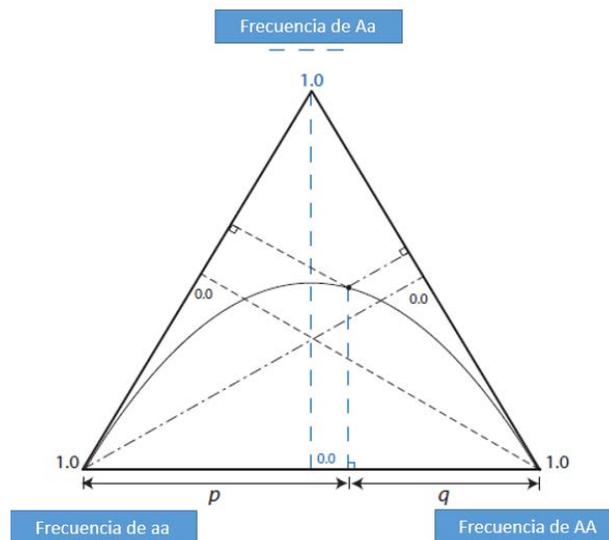
Para identificar si un polimorfismo está relacionado con enfermedad primero es importante tener evidencia de que al menos una fracción de la enfermedad está determinada genéticamente, asimismo se deben considerar las bases biológicas de vías que subyacen al rasgo que se desea estudiar o basarse en estudios que lo sustenten (Hattersley *et al.* 2005), para lo cual los estudios de familias, gemelos e inmigrantes son de gran apoyo (como se mencionó en el apartado anterior). Segundo, se deben de identificar los lugares del genoma en donde están los genes de interés para la enfermedad, para ello se realizan estudios de ligamiento en los que se emplean como marcadores genéticos una serie de polimorfismos repartidos a lo largo del genoma, donde se emplean familias grandes con varios individuos afectados, a su vez esto permite ubicar zonas del genoma de interés para el desarrollo de la enfermedad y posteriormente realizar estudios para identificar genes o polimorfismos de estos genes asociados. Después, al asociar se compara la frecuencia relativa de las diferentes variantes de una serie de polimorfismos entre los individuos afectados y un grupo control adecuado (Iniesta *et al.* 2015).

Aunque existen diferentes diseños como lo son los estudios de familias y de cohortes, el estudio caso-control arquetípico es en el que se centra este estudio. Compara dos grupos que se espera que difieran en su prevalencia de los alelos de susceptibilidad a la enfermedad, siempre y cuando el muestreo ha sido apropiado (Hattersley *et al.* 2005).

Para el análisis estadístico primero se estiman las frecuencias alélicas y genotípicas, calculadas a partir de los resultados experimentales (normalmente PCR-RT, el cual se explica en el apartado de metodología). Generalmente los SNP's son bialélicos, es decir, que para un locus solo existen 2 nucleótidos posibles (con sus respectivos nucleótidos complementarios), los cuales se pueden acomodar en 3 genotipos (2 homocigotos y 1 heterocigoto) (Iniesta *et al.* 2015).

Cuando ambas frecuencias han sido estimadas, entonces se procede a calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), el cual determina qué frecuencias deben

observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos, o viceversa, la relación entre ambas es:  $p^2+2pq+q^2$ , donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas para un locus bialélico (Hamilton 2009). Las frecuencias se van a comportar de tal forma siempre y cuando se sigan las siguientes suposiciones: que el organismo sea diploide, la reproducción sea sexual, las generaciones sean discretas y no sobrelapadas, locus bialélicos, migración despreciable, no hay selección natural, las frecuencias alélicas son idénticas en todos los tipos de parejas, los apareamientos son al azar, la talla de la población es grande y no ocurren mutaciones o son muy raras (Hamilton 2009). Una forma gráfica de visualizarlo es mediante el diagrama DeFinetti como se muestra en la figura 6, debido a que muchos SNP's están relacionados con enfermedad, se esperaría que la selección natural actué sobre ellos por lo que sus frecuencias se desviarían del equilibrio, esto sería esperado encontrar en casos.



**Figura 3:** Diagrama DeFinetti para un locus con 2 alelos. El sistema de coordenadas triangular se debe a que la suma las frecuencias de los 3 genotipos debe de sumar 1. Cualquier punto dentro o en el borde del triángulo representa las 3 frecuencias genotípicas de una población. La parábola describe las frecuencias esperadas para el equilibrio de HW. Las líneas punteadas representan las frecuencias de los 3 genotipos entre 0 y 1. Las frecuencias en cualquier punto pueden ser determinadas por la longitud de las líneas que son perpendiculares a cada uno de los lados del triángulo. El punto en la parábola es una población en equilibrio de HW, donde la frecuencia de AA es 0.36, aa 0.16 y Aa 0.48. La línea perpendicular a la base del triángulo divide a las bases en 2 regiones correspondientes a la longitud de las frecuencias alélicas, cualquier población fuera de la parábola tiene un exceso o déficit de heterocigotos comparados con las esperadas para el equilibrio HW.

Tomada y modificada de Hamilton 2009.

Para conocer si las frecuencias genotípicas se ajustan al equilibrio de HW existen muchos programas que realizan la comparación, estos pueden realizar diferentes estadísticos como un test de Fisher, sin embargo los más comunes son los test de  $X^2$ , los cuales comparan las frecuencias genotípicas observadas y esperadas del equilibrio de HW (Cacheiro-Martínez, 2011). Es importante que las frecuencias de controles se ajusten al modelo (lo que nos indicaría que son representantes de la población general) ya que de no ajustarse podría representar un sesgo (Cacheiro-Martínez, 2011). Para una mayor descripción del equilibrio HW ver anexos.

Cuando se ha realizado lo anterior, entonces se procede a realizar el estudio de asociación. Un SNP's constituye una variable categórica que se agrupa en 3 genotipos. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de  $X^2$ . Después de realizar la asociación mediante  $X^2$ , se pueden calcular los odds ratios (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación (riesgo o protección) (Iniesta *et al.* 2015).

La razón de momios u odds ratio (OR) ha sido ampliamente usada en la investigación biomédica con el fin de presentar la asociación con un evento (muerte, enfermedad, accidentes, etc.) y la vulnerabilidad de que suceda. Particularmente un OR es la razón de la probabilidad de que un evento ocurra sobre la probabilidad de que no ocurra, todo esto sobre la probabilidad de que un evento ocurra sobre la probabilidad de que no ocurra, es decir, es la razón de dos razones. En el caso de los estudios de asociación genética es el producto de dividir el número de individuos que poseen la variante genética de interés y que presentan el fenotipo estudiado, sobre el número de individuos que poseen la variante genética y que no presentan el fenotipo de riesgo (Aedo *et al.* 2010). Así un  $OR < 1$  se interpreta como que el desenlace es menos frecuente en la categoría o grupo que se ha elegido como de interés (con la variante genética el fenotipo) si en el grupo de referencia (con la variante genética sin el fenotipo) el evento ocurriera por azar, en otras palabras, indica que los individuos con la variante genética poseen protección (o que es menos probable que desarrollen tal fenotipo) ante el rasgo estudiado, en cambio un

OR>1 indica que los individuos con tal variante poseen riesgo ante ese fenotipo(Aedo *et al.* 2010).

Además de esto, los modelos de asociación se pueden ajustar por diferentes variables que podrían estar influenciando el fenotipo, para tales casos se usa la correlación logística por múltiples covariables. Por ejemplo si se llama p a la probabilidad de ser caso, G al polimorfismo (que codificará los diferentes genotipos: TT, TC, CC) y Z a una o más variables por las que se desea ajustar el modelo. El modelo logístico se define por la ecuación:  $\log [p/ (1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$ , donde  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son parámetros estimados. Además, si se supone que en el polimorfismo, G es un SNP en el que el alelo variante “C” modifica el riesgo de la enfermedad de interés y debido a que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de C, esto permite definir varios modelos de herencia (Iniesta *et al.* 2015). Un ejemplo de lo anterior se plasma en la tabla 2.

Modelo de herencia	Genotipo	Casos (C)	Controles ( $\bar{C}$ )	OR	Modelo estadístico para un evento dicotómico
Dominante	AA	$C_0$	$\bar{C}_0$	1,0	$\log \left[ \frac{P}{(1-P)} \right] = \beta_0 + \beta_1(AG+GG) + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i$
	AG+GG	$C_1$	$\bar{C}_1$	$OR = \frac{C_1 \bar{C}_0}{C_0 \bar{C}_1}$	
Recesivo	AA+AG	$C_0$	$\bar{C}_0$	1,0	$\log \left[ \frac{P}{(1-P)} \right] = \beta_0 + \beta_1(GG) + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i$
	GG	$C_1$	$\bar{C}_1$	$OR = \frac{C_1 \bar{C}_0}{C_0 \bar{C}_1}$	
Codominante	AA	$C_0$	$\bar{C}_0$	1,0	$\log \left[ \frac{P}{(1-P)} \right] = \beta_0 + \beta_1(AG) + \beta_2(GG) + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_i X_i$
	AG	$C_1$	$\bar{C}_1$	$OR = \frac{C_1 \bar{C}_0}{C_0 \bar{C}_1}$	
	GG	$C_2$	$\bar{C}_2$	$OR = \frac{C_2 \bar{C}_0}{C_0 \bar{C}_2}$	
Sobredominante	AA+GG	$C_0$	$\bar{C}_0$	1,0	$\log \left[ \frac{P}{(1-P)} \right] = \beta_0 + \beta_1(AG) + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i$
	AG	$C_1$	$\bar{C}_1$	$OR = \frac{C_1 \bar{C}_0}{C_0 \bar{C}_1}$	
Aditivo					$\log \left[ \frac{P}{(1-P)} \right] = \beta_0 + \beta_1(G) + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i$

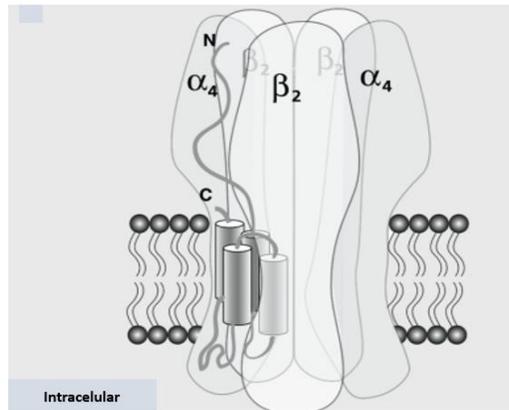
**Tabla 2:** Ejemplo de cálculo de correlaciones logísticas para los modelos de herencia en un SNP con alelos: A y G. En el modelo aditivo los portadores del homocigoto GG tienen el doble de riesgo que los heterocigotos AG, por tal motivo no pueden ser representados en la columna de genotipo y la celda correspondiente aparece en blanco.  $\log [P/(1-P)] =$  logaritmo del momio (OR), donde P representa la probabilidad de tener el evento. En eventos cuantitativos, el logaritmo del momio (OR) es el promedio estimado de este evento;  $\beta$ : coeficientes de regresión;  $\beta_0$ : ordenada al origen. Para eventos categóricos el exponencial del coeficiente de regresión ( $\beta$ ) es igual al estimador del riesgo; OR: ( $e^\beta = OR$  1); X: representa a otros factores de exposición. Abreviaturas. C0: casos con el genotipo de no riesgo (AA), en los modelos estadísticos representa la categoría de referencia; C1: casos con el alelo de riesgo (AG+GG); C2: casos con el genotipo de riesgo (GG) (representación similar para los controles); OR: razón de momios.

Tomada modificada de Flores-Alfaro *et al* 2012.

## Receptores nicotínicos de acetilcolina

Como se ha descrito en los apartados de fisiología, neurotransmisión y bases genéticas, los nAChR's son un blanco potencial para el desarrollo de estudios de asociación genética, por lo cual a continuación se explican algunas de sus características. Desde finales de la primera mitad del siglo XX se conoce el receptor específico para la nicotina en el sistema nervioso central, el cual se denomina receptor nicotínico colinérgico (nAChR) con sus diversos subtipos. Se trata de un canal iónico que se activa por diversos ligandos específicos que provocan la apertura y la entrada de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y sodio ( $\text{Na}^{+}$ ) (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012).

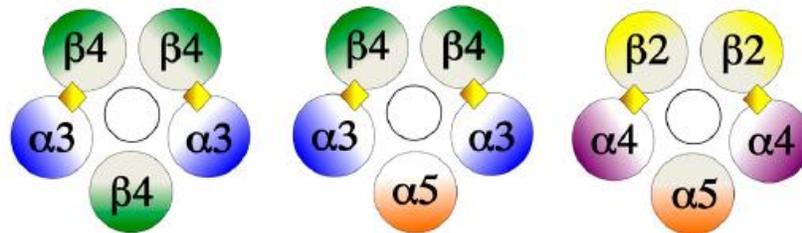
Los estudios bioquímicos de Arthur Krlin y Jean- Pierre Changeux indican que el receptor nicotínico de acetilcolina es una glicoproteína de membrana formada por 5 subunidades que pueden ser: dos alfas, una beta, una gamma y una delta, sin embargo pueden ensamblarse como heteropentámeros u homopentámeros (Figura 4). Las terminales amino de cada una de las subunidades están expuestos en la superficie extracelulares de la membrana. El amino terminal de la subunidad alfa posee un sitio que se une a la acetilcolina con gran afinidad además de que posee muchos agonistas, entre los que se encuentra la nicotina (Figura 4). Una molécula de acetilcolina debe de unirse a cada una de las subunidades alfa para que exista una correcta apertura del canal. Actualmente es conocida la estructura del poro del canal gracias al análisis de secuencia del aminoácido primario de las subunidades del canal receptor (Kandel Eric. R. *et al.* 2000).



**Figura 4:** Vista lateral de un receptor nicotínico colinérgico formado por las subunidades  $\alpha_4$  y  $\beta_2$ , dentro de la subunidad  $\alpha$  posicionada en el lado izquierdo se pueden apreciar los dominios transmembranales (a manera de cilindros), así como el carboxilo y amino terminal. Tomada y modificada de Bertrand D. 2005.

Se piensa que estos receptores son hetero pentámeros compuestos de subunidades homologas; actualmente existe una propuesta, que afirma que dichos canales poseen su estructura primaria más conservada para cada subunidad un dominio N- terminal extracelular seguido de 3 dominios conservados transmembranales, un loop variable citoplasmático, un cuarto dominio transmembranal y un C- terminal extracelular. Es posible que las subunidades de los nAChRs se acomoden de muchas maneras y las características de cada nAChRs, está dada por las subunidades que contiene (Albuquerque Edson X. *et al.* 1997).

Estructura de los nAChRs:



**Figura 5:** Posible acomodo de los nAChR's que contienen las subunidades alfa-3 y alfa- 4, rombos en amarillo representan el sitio de unión a ligando, el círculo blanco en medio de las 5 subunidades representa el poro del canal. Tomada y modificada de Reina D. Ma. *et al.* 2010.

La longitud de aminoácidos de cada subunidad es  $\alpha_3$ : 489 aa,  $\alpha_4$ : 451 aa,  $\alpha_5$ : ~468 aa,  $\beta_2$ : 504 aa,  $\beta_4$ : ~498 aa (Benson et al. 2005 GeneBank).

En el cerebro, la nicotina además de activar estos receptores y provocar la liberación de dopamina, serotonina, glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), y acetilcolina, también genera la liberación de noradrenalina, péptidos opioides endógenos y facilita la liberación de las hormonas de crecimiento (GH) y adrenocorticotrófica (ACTH) (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012).

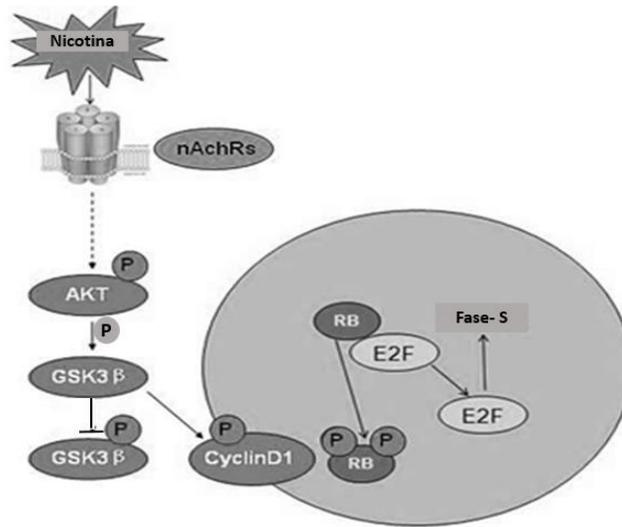
Un completo rango de funciones cerebrales recae en los nAChRs incluyendo dormir, excitación, fatiga, ansiedad, atención, percepción del dolor y memoria. Los canales también se activan antes del nacimiento lo que sugiere que están involucrados en el desarrollo temprano del cerebro (Dwyer Jennifer B. *et al.* 2009).

Además de los circuitos neuronales descritos en el apartado de neurobiología, los nAChR modulan las vías involucradas en la respuesta al estrés (estimula el eje hipotálamo-hipófisis- adrenal, aumenta la liberación de corticoesteroides), lo que provoca ansiedad y depresión, por lo que la nicotina puede funcionar como ansiolítica o ansiógena dependiendo de la dosis, tiempo y vía de administración, al actuar en el núcleo dorsal del rafe, septum lateral, hipocampo (Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012).

Por otro lado los receptores de acetilcolina son muy importantes no solo en el sistema nervioso central, también se encuentran en gran medida en las placas neuromusculares, aunado a esto, estudios recientes han revelado que no solo se expresan en células neuronales sino también en células del pulmón, glía, queratinocitos, células endoteliales, así como en células del sistema digestivo y sistema inmune, por lo que existe evidencia de que estos receptores juegan un rol crucial en las vías de transducción de muchos procesos fisiológicos fuera de sistema nervioso central (Reina D. Ma. *et al.* 2010).

Estudios recientes sugieren que la nicotina y las nitrosaminas (productos de la combustión del tabaco) se pueden unir a los receptores nAChR's en casos de cánceres de pulmón e inducir el crecimiento potencial de progresión tumoral, así como también la nicotina puede inducir vías mitogénicas que promueven la angiogénesis y la activación de Akt (Proteína cinasa B) (figura 5) lo que funciona como un agonista de supervivencia inhibiendo apoptosis ya que promueve la

activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y la inactivación de proteínas proapoptóticas como Bax, Bad a través de la fosforilación y la activación de la vía Akt en células de cáncer de pulmón (Carcereny Enric. *et al.* 2010) todo esto debido a que la nicotina funciona como un factor de crecimiento induciendo el paso de la fase G1 a S del ciclo celular (figura 6).



**Figura 6:** Representación de la señal proliferativa de la nicotina sobre los nAChR's de células musculares lisas de la vía aérea de la rata, mediante la activación de Akt, a su vez Akt activa una red que regula positivamente el ciclo celular mediante la progresión de G1 / S ya que fosforila e inactiva GSK3β, lo que provoca el aumento de Ciclina D1. En consecuencia la ciclina D1 se transloca a el núcleo y forma una holoenzima con CDK4 / 6 para fosforilar la proteína RB, cuyo resultado es la liberación de E2F. Así E2F permanece unido a los promotores de genes proliferativos, facilitando de este modo la entrada en la fase S. Tomada y modificada de He Fang *et al.* 2014.

Además se ha observado que los receptores nicotínicos participan en la diferenciación neuronal y plasticidad sináptica, lo que es importante para la formación neuroquímica de la memoria y el aprendizaje (Rezvani *et al.* 2001).

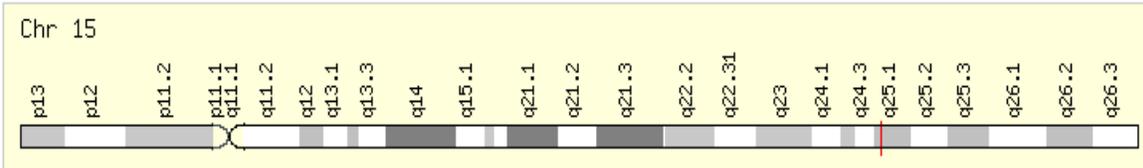
## Descripción genómica

Se ha demostrado que los cuatro tipos de subunidades que forman los nAChR's son codificados por genes distintos, aunque relacionados entre sí (Kandel Eric. R. *et al.* 2000). Desde hace ya varios años se han hecho estudios comparativos en las secuencias de las subunidades, lo que mostró que la mitad de los restos de aminoácidos son idénticos o presentan sustituciones de tipo conservador, esto sugiere que todas las subunidades tienen estructura similar, además los cuatro genes son homólogos, es decir provienen de un gen ancestral común (S. Numa *et al.* 1983).

Las subunidades se clasifican como subunidades alfa, si tienen un par de cisteínas adyacentes como parte del presunto sitio de unión a acetilcolina; las subunidades que carecen de estos residuos de cisteína se clasifican como subunidades beta (NCBI Resource Coordinators, 2016). Debido a que las subunidades  $\alpha$  son el blanco de unión de la nicotina en el cerebro y a que diferentes estudios de GWAS respaldan la asociación de SNP's de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , el blanco de este estudio fueron SNP's dentro de los genes de estas subunidades mediante el diseño de un estudio de asociación genética (ver siguiente apartado). Y aunque el efecto neurobiológico inducido por la nicotina se describió en el apartado de neurobiología, los receptores varían en sus características fisiológicas dependiendo del tipo de subunidad del que se formen, además de que existen diferencias en las zonas del cerebro donde se expresan los diferentes tipos de subunidades (Albuquerque Edson X. *et al.* 1997), de lo cual se hablará de manera particular para las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  más adelante. Asimismo, es importante detallar el rol que SNP's dentro de genes de estas subunidades tienen en aspectos cognitivos, porque además de los procesos adictivos, las personas también pueden llegar a auto administrarse nicotina con el fin de mitigar déficits cognitivos (Lising Enriquez, 2009).

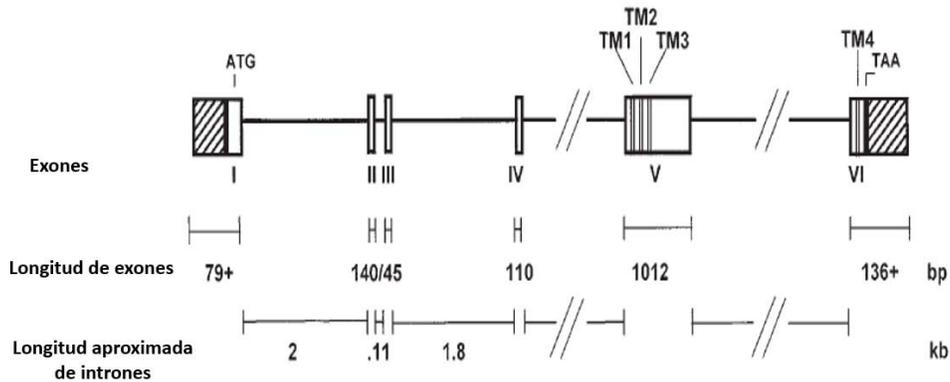
## Gen *CHRNA3*: Receptor Nicotínico Colinérgico $\alpha$ -3

Este gen codifica para la subunidad  $\alpha$  -3 de los nAChR's; está ubicado en el cromosoma 15 en la banda 15q25.1



**Figura 7:** Cromosoma 15, sitio de ubicación del gen *CHRNA3*. La banda roja marca la ubicación dentro del cromosoma, GeneCards, Stein T *et al.* 2016.

La longitud del gen es de 28244 bp y consta de 6 exones:



**Figura 8:** Organización genómica del gen *CHRNA3*, los rectángulos con números romanos representan los exones y su longitud (bp: pares de bases), abajo se muestran los intrones con su longitud (kb: kilo bases), los fragmentos que codifican para los dominios transmembranales hidrofóbicos así como su ubicación está señalada con las letras TM1-TM4.

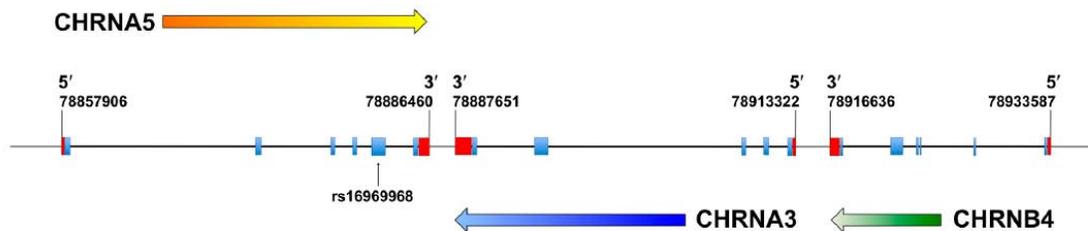
Tomada y modificada de Rempel Nicole., *et al.* 1998.

Los receptores que contienen la subunidad alfa 3 son altamente expresados en zonas del cerebro que tienen que ver con recompensa, emociones, aprendizaje y memoria (CP, amígdala y NA) así como en regiones relacionadas con la aversión (Habénula medial) (Doyle Glenn A. *et al.* 2011).

También es expresada en el tronco cerebral, cerebelo, sustancia nigra, glándula pineal, hipocampo, ATV y núcleo interpeduncular (Reina D. Ma. *et al.* 2010); fuera del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico es altamente expresada en el pulmón y su expresión aumenta en casos de carcinoma de pulmón de células pequeñas (Improgo *et al.* 2010).

Se han realizado estudios de asociación de genoma completo (GWAS: Genome-wide association study) en poblaciones europeas y americanas donde se encontró asociación en genes localizados entre los locus 15q24/15q25.1, que incluye variantes de las subunidades  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -5 las cuales fueron asociados con el riesgo de cáncer de pulmón y dependencia a la nicotina (Amos Cl. *et al.* 2008 y Caporaso Neil *et al.* 2009).

En cuanto a su estructura génica el gen que codifica para la subunidad alfa-3 se encuentra dentro de un *cluster* formado por los genes *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*:



**Figura 9:** Estructura del cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*, los números indican la posición del inicio y término de cada uno de los genes así como su orientación (Reina D. Ma. *et al.* 2010).

Por otro lado un estudio de GWAS realizado por Cho *et al.* 2014 identificó que el *locus* donde se encuentra el gen *CHRNA3* es de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad obstructiva del pulmón, una de las principales causas de defunción a nivel mundial; además dentro de este mismo estudio se hizo un meta análisis que identificó al *loci* formado por los genes *CHRNA3/CHRNA5/IREB2*, como un *loci* con fuerte equilibrio de ligamiento, es decir, que se heredan como un haplotipo. Dentro de los SNP's del gen *CHRNA3*, el SNP rs 1051730 ha sido asociado con la

Dependencia a la Nicotina (DN) y con otros procesos neurobiológicos cognitivos como se verá a continuación.

### **SNP: rs 1051730**

Este polimorfismo se encuentra dentro del exón 5, es un locus bialélico con alelos: C (Ancestral) y T, se ha reportado que la sustitución de base no cambia el aminoácido (NCBI Resource Coordinators, 2016). Se ha vinculado con dependencia a la nicotina, en un estudio se vio que los portadores del alelo T poseen menor riesgo de convertirse en fumadores comparados con individuos portadores del alelo C (Thorgeirsson *et al.* 2008) pero debido a esto individuos que poseen el alelo T tienden a consumir más cigarrillos para alcanzar el efecto neurobiológico regular, una vez dependientes necesitan mayor cantidad de nicotina, por lo que a su vez el consumo de tabaco es mayor (Berrettini *et al.* 2008) también se ha asociado con poca probabilidad para dejar de fumar (Freathy *et al.* 2009), por otro lado existe evidencia dentro de la literatura científica que vincula al polimorfismo con el desarrollo del cáncer de pulmón (Amos *et al.* 2008 y Hung J. Rayjean *et al.* 2008). Según los datos de IARC (por sus siglas en inglés: International Agency for Research on Cancer) para el 2012 el tipo de cáncer que provocó más muertes en el mundo para ambos sexos es el cáncer de pulmón (IARC 2012).

Estudios de meta-análisis en población china han demostrado asociación entre este SNP y cáncer de pulmón; entre casos de cáncer de pulmón y controles encontraron valores de odds ratio (OR) de riesgo (CT y TT OR= 1.93; TT OR= 1.63) para los portadores del alelo T tanto homocigotos como heterocigotos, por lo que individuos que poseen al menos una copia del alelo T poseen mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Ping Zhan *et al.* 2015).

En otros estudios se ha asociado dicho polimorfismo con el nivel de equivalentes de nicotina y de nitrosaminas derivadas del tabaco en muestras de orina, como medida más precisa de Dependencia a la Nicotina (DN) que la autoreportada por pacientes, en una muestra de pacientes de ancestría Europea, Nativa Hawaiana y Japonesa (Loïc Le Marchand *et al.* 2008); los resultados de este estudio demuestran que en

personas de origen Hawaiano los pacientes genotipificados con el alelo T muestran niveles significativamente más altos de equivalentes de nicotina mostrando un efecto génico dominante, es decir, no solo afecta a los homocigotos T, sino también a los heterocigotos, lo que indica mayor consumo de cigarrillos en individuos portadores de alelo T (Loïc Le Marchand *et al.* 2008).

Además de las asociaciones antes mencionadas, se ha encontrado que dicho polimorfismo además está relacionado con el consumo y respuesta al alcohol (Joslyn *et al.* 2008).

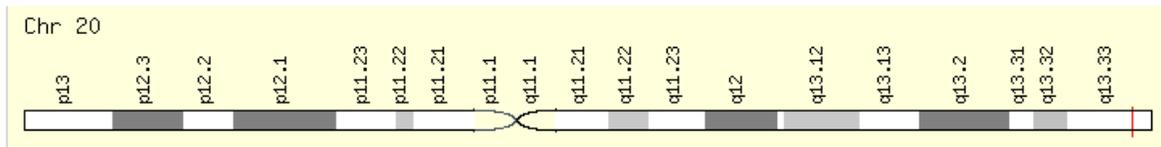
Además de la respuesta psicoactiva mediada por los nAChR's, múltiples estudios mencionan que están vinculados con habilidades cognitivas y focos de atención, en particular este SNP tiene efectos en gatillos sensor-motores mediante los efectos producidos por la nicotina. Los gatillos sensor-motores son medidos por la inhibición de prepulso, y se ha visto que la nicotina puede potenciar la inhibición de prepulso en humanos (Duncan *et al.* 2001); La inhibición de prepulso se encarga de mitigar al reflejo de la respuesta de sobresalto que está implicada en preparar al individuo para la respuesta de ataque o defensa, dicha respuesta se genera en estructuras de formación reticular del tronco cerebral y puede variar cuando está sometida a influencias del contexto emocional, el estado atencional o la actividad cerebral; se piensa que la regulación emocional de la respuesta se lleva a cabo en la amígdala; la inhibición de prepulso se da mediante la presentación de un estímulo previo (prepulso) seguido de la presentación del estímulo sensorial generador de sobresalto (pulso), el prepulso no genera la respuesta de sobresalto y actúa como barrera inhibitoria de cualquier estímulo posterior, de esta manera la inhibición de prepulso aísla al individuo de ser inundado por una sobrecarga estimular (García Sánchez *et al.* 2011).

Nadine Petrovsky y su equipo han realizado varios estudios de asociación entre el polimorfismo rs1051730 y su efecto en el gatillo sensor-motor en pacientes sanos y pacientes con esquizofrenia, se ha visto que los homocigotos TT fueron asociados con un decremento en los niveles de inhibición de prepulso y que además la nicotina puede potenciar la inhibición de prepulso en homocigotos TT, es razonable tal deducción y la asociación de que los pacientes con esquizofrenia se auto

administran nicotina al fumar como un medio de mejorar déficits cognitivos por dicho desorden, lo cual también podía implicar una razón de consumo en pacientes con otros desordenes como el trastorno bipolar (Petrovsky *et al.* 2013).

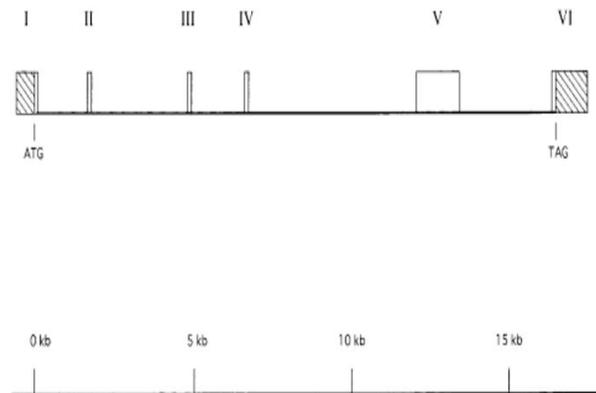
### Gen *CHRNA4*: Receptor Nicotínico Colinérgico $\alpha$ -4

Está ubicado en el cromosoma 20 en la banda 20q13.33:



**Figura 5:** Cromosoma 20, sitio de ubicación del gen *CHRNA4*. La banda roja marca la ubicación dentro del cromosoma, GeneCards Stein T *et al.* 2016.

Consta de 6 exones distribuidos en aproximadamente 17 kb de DNA genómico:



**Figura 6:** Organización genómica del gen *CHRNA4*, arriba se muestran los exones del 1 al 6 marcados con números romanos, asimismo se muestran los intrones y la marca de longitud en kilo bases (Steinlein *et al.* 1996).

Ming D. Li *et al.* Menciona que existe asociación genética de dependencia a la nicotina con el receptor colinérgico alfa 4, además de que la evidencia química

sugiere que el receptor  $\alpha$ -4 $\beta$ -2 constituye la mayor parte de los sitios de unión de alta afinidad a nicotina en el cerebro y que los genes para ambas subunidades son regulados positivamente por la exposición crónica a nicotina. Asimismo en dicho estudio se reportó que la activación de *CHRNA4* en pacientes es suficiente para la recompensa, la tolerancia y sensibilización inducida por la nicotina. Por otra parte estudios en ratones knockout para las subunidades  $\alpha$ -4 ó  $\beta$ -2 no muestran los sitios de unión de alta afinidad a nicotina en sus cerebros y fallan al auto administrarse nicotina, lo que indica que estas subunidades juegan un papel primordial en los efectos reforzantes de la nicotina.

Además esta subunidad ha sido relacionada con otras enfermedades como epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante (Hirose S. *et al*, 1999), déficit de atención e hiperactividad (Kent L. *et al*. 2001) y enfermedad de Alzheimer (Chou IC *et al*. 2003). Uno de los polimorfismos dentro de este gen que ha sido asociado con DN es el rs 1044396, del cual se hablará enseguida.

### **SNP: rs 1044396**

Dicho polimorfismo se encuentra en el exón 5 del gen *CHRNA4*, es un locus bialélico con alelos: C (Ancestral) y T, se ha reportado que la sustitución de base no cambia el aminoácido (NCBI Resource Coordinators, 2016). Existen números estudios que vinculan el polimorfismo rs 1044396 con la dependencia a la nicotina. En un estudio de varones orientales se encontró que la variante alélica T para dicho polimorfismo resulta en un fenotipo protector para la dependencia a la nicotina, en otras palabras, los portadores del alelo T para este SNP poseen menor riesgo de desarrollar dependencia, sin embargo este no se traduce en un cambio de aminoácido a nivel de proteína, por lo que el mecanismo por el cual este cambio de base confiere protección no se ha dilucidado; además en dicho estudio se buscó la presencia de haplotipos, encontraron una asociación significativa para el haplotipo formado por los SNP's: rs2273504, rs2273502, rs1044396, rs1044397, rs3827020 y rs2236196

en la dirección 5'- 3' para los casos de adicción a la nicotina ( $p < 0.001$ ) (Yang Feng, *et al.* 2004).

Schizhong Han *et al.* 2011 realizó un estudio en 2 poblaciones (europeo-americano, Afroamericanos) para probar polimorfismos del gen *CHRNA4* y su asociación con fumar. Se encontró que el polimorfismo rs1044396 mostró asociación significativa con dependencia a la nicotina en una muestra de varones chinos, sin embargo no se reportó asociación en población europeo-americana y afroamericana. La correlación entre ambos SNP's fue baja para ambas poblaciones lo que se sugiere que múltiples variables independientes dentro este gen podrían estar asociadas con diferentes dimensiones con el tabaquismo (Schizhong Han *et al.* 2011).

Un estudio realizado con 483 pacientes fumadores brasileños en el que se comparó el efecto de terapias para dejar de fumar con vareniclina, bupropión y terapia de reemplazo a la nicotina de acuerdo con el genotipo del SNP rs1044396 reveló que los pacientes con el genotipo CC (homocigotos para citosina) tuvieron la menor tasa de éxito (29% de éxito) en el tratamiento en comparación con los individuos de genotipo TT o CT (Rocha Santos Juliana *et al.* 2015).

Al mismo tiempo un estudio electrofisiológico de expresión de receptores nicotínicos en ovocitos de *Xenopus* para haplotipos del exón 5 dentro del gen *CHRNA4* (incluyendo al SNP rs1044396) demostró que los portadores del alelo C para este polimorfismo poseen mayor número de receptores de alta afinidad en comparación para los que contienen el alelo T, lo que significa que los portadores del alelo C requieren una menor cantidad de ligando (agonistas del receptor, por ejemplo: acetilcolina o nicotina) para ocupar los sitios de unión al receptor, lo que a su vez puede provocar mayor predisposición para que las personas portadoras de este alelo generen adicción a la nicotina, en cambio los portadores del alelo T estarían protegidos, sin embargo al igual que el cambio de base para el SNP rs1051730, el cambio en este SNP no produce un cambio de aminoácido, de tal forma el mecanismo por el que este alelo (T) confiere protección no se conoce (Winterer, G. *et al.* 2011).

Por otro lado este SNP también ha sido asociado con aspectos de cognición, se ha visto que el proceso de atención viso-espacial depende de conexiones entre la

corteza parietal-frontal las cuales son moduladas por los sistemas colinérgicos. Técnicas de imagen y ERP (por sus siglas en inglés events related potential) muestran mayor actividad neuronal asociada con la detección de objetivos en portadores del alelo T (Rocha Santos Juliana *et al.* 2015).

En otro estudio se observó que el alelo C de este mismo SNP afecta la fuerza de la escala de atención en un modelo aditivo, lo que sugiere que dicho SNP contribuye de manera individual en atención viso espacial (Greenwood *et al.* 2005).

## **Justificación**

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública, en México cada día mueren 118 personas a causa del tabaquismo principalmente debido a que es factor preponderante para 6 de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial. En México el consumo de tabaco ocasiona anualmente 16,408 casos de cáncer y 94,033 infartos lo que supone un grave problema de salud pública, ya que el gasto para los problemas de salud derivados del consumo de tabaco supone el equivalente al 0.34% del producto interno bruto (\$ 61,252 millones de pesos). Por otro lado se ha visto que existe un alto porcentaje de pacientes con trastornos psiquiátricos que consumen cigarro siendo esta cifra aproximadamente del 60% en general e incluso llega a ser del 80% en pacientes con trastorno bipolar.

Como se ha descrito la etiología del tabaquismo es multifactorial y compleja, radica en factores tanto sociales como genéticos. En cuanto a la parte de este fenotipo atribuible a factores genéticos, los nAChR's juegan un rol importante en la neurobiología del proceso adictivo ya que son el blanco de unión de la nicotina dentro del SNC.

Existe amplia gama de evidencia en cuanto a la asociación de polimorfismos dentro de los genes *CHRNA3* y *CHRNA4* con la conducta de dependencia a la nicotina, en población regular y con mayor medida en personas con los trastornos antes mencionados.

En cuanto al gen *CHRNA3* numerosos estudios vinculan SNP's como el rs 1051730 con adicción a la nicotina así como para el desarrollo del cáncer de pulmón.

El gen *CHRNA4* codifica para una de las subunidades del receptor, el SNP rs1044396 que se encuentra dentro de una de las regiones de este gen que está altamente asociada con el tabaquismo en estudios de GWAS; así también dicho SNP ha sido vinculado con funciones cognitivas relacionadas con los focos de atención.

La literatura menciona reportes de estudios que se han llevado a cabo en poblaciones europeas, asiáticas y afroamericanas; sin embargo no existen estudios en población mexicana, lo que sugiere un amplio campo de investigación debido a la herogeneidad de la población del país derivada del proceso de mestizaje.

Uno de los posibles blancos de la investigación genómica en este aspecto podría ser plantear estrategias para campañas de dejar de fumar. Existen diferentes estrategias para dejar de fumar y poseen diferencias en el grado de eficacia dependiendo del contexto de la etnicidad. Por ejemplo se ha visto que en latinos dentro de Estados Unidos no es muy común la terapia de reemplazo a la nicotina, sin embargo el recibir consejo para dejar el consumo no mostró diferencias entre grupos por lo que además los estudios genéticos dentro de este campo podrían dar un mayor entendimiento del problema y así focalizar estrategias para dejar el consumo (Zinser *et al.* 2011).

## Objetivos generales

Mediante un diseño casos-contróles se determinará si existe asociación genética entre los polimorfismos rs1051730 del gen *CHRNA3* y rs1044396 del gen *CHRNA4* en 2 poblaciones: 1) Pacientes con trastorno bipolar y dependencia a la nicotina y 2) Pacientes únicamente con dependencia a la nicotina (sin trastorno bipolar).

## Objetivos particulares

- Establecer las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNP's: rs1051730 del gen *CHRNA3* y rs1044396 del gen *CHRNA4* en: 1) Pacientes con trastorno bipolar/dependencia a la nicotina, 2) Pacientes con dependencia a la nicotina y 3) Controles.
- En caso de encontrar asociación entre los polimorfismos antes mencionados, cuantificar la magnitud de la asociación (riesgo o protección) de los SNP's: rs1044396 del gen *CHRNA4* y rs1051730 del gen *CHRNA3* en: 1) Pacientes con trastorno bipolar/dependencia a la nicotina, y 2) Pacientes con dependencia a la nicotina, mediante el cálculo de OR.
- Mediante correlaciones logísticas obtener el posible mecanismo de herencia así como integrar la posible interacción de patrones sociodemográficos como: sexo, edad, escolaridad, el nivel de dependencia a nicotina con el genotipo.

## Hipótesis

- Con base en la literatura se espera encontrar mayor dependencia a la nicotina en pacientes con trastorno bipolar/dependencia a la nicotina en comparación con pacientes con dependencia a la nicotina.
- Si se observan niveles de dependencia altos en las poblaciones de estudio entonces se espera encontrar asociación genética del polimorfismo rs1051730, donde el alelo T muestre fenotipo de protección (OR  $\sim <1$ ) con el modelo de herencia dominante, hacia el desarrollo de dependencia a la nicotina en contra del alelo C en: 1) Pacientes con trastorno bipolar/dependencia a la nicotina, y 2) Pacientes con dependencia a la nicotina.
- Así mismo para el polimorfismo rs1044396 del gen *CHRNA4* se espera que el alelo T funja como un alelo de protección (OR  $\sim <1$ ) con el modelo de herencia dominante, hacia el desarrollo de dependencia a la nicotina en contra del alelo C en: 1) Pacientes con trastorno bipolar/dependencia a la nicotina, y 2) Pacientes con dependencia a la nicotina.
- Datos epidemiológicos afirman que el consumo de tabaco es mayor en individuos de sexo masculino, individuos en el estrato adulto y con menor escolaridad, por lo que se espera que individuos con mayor grado de dependencia y con estas características antes mencionadas sean cargadores de los alelos de riesgo.

## Metodología

### Obtención de las muestras de sangre

De acuerdo con un estudio se determinó el tamaño muestral requerido para alcanzar el 80% de potencia estadística según los modelos de herencia y odds ratios de heterocigotos/ homocigotos raros, al utilizar un solo marcador SNP en un estudio de casos y controles, bajo los supuestos de 5% de prevalencia de la enfermedad, 5% en frecuencia del alelo menor, completo desequilibrio de ligamiento, relación caso a control 1: 1 y tasa de error de tipo I de  $\alpha = 5\%$  (Eun Pyo Hong *et al.* 2012). El modelo dominante requería el tamaño de muestra más pequeño para alcanzar el 80% de potencia en comparación con otros modelos (53 para valores de OR 2.5/4) (Eun Pyo Hong *et al.* 2012). Y como se ha mencionado anteriormente, cada uno de los SNP analizados en este estudio están en genes ubicados en cromosomas diferentes y se ha documentado que ambos alelos a probar se han ajustado al modelo dominante para la característica dependencia a la nicotina, debido a esto la muestra en este estudio incluyó en total 255 individuos reclutados no relacionados entre sí, los cuales fueron divididos en dos cohortes de pacientes: 1) Pacientes con trastorno bipolar y dependencia a la nicotina (TB y DN) (n=67) y 2) Pacientes únicamente con DN (n=97) ambos de origen mexicano (Nacionalidad) de la región centro-golfo de la República (Tabasco y de la Ciudad de México). Los pacientes con trastorno bipolar fueron diagnosticados mediante los criterios del DSM-IV.

En primer lugar se preguntó a ambos grupos de pacientes si consumen tabaco o han sido consumidores en algún momento de su vida, sujetos con respuestas afirmativas fueron tomados en cuenta. Posteriormente con el fin de conocer el nivel de dependencia física a la nicotina se realizó el Test de Fagerström (Heatherton TF *et al.* 1991) sin embargo es posible ser consumidor de tabaco y aun así exhibir puntajes bajos o igual a cero en este test, para una mayor descripción sobre las características del test ver apartado de anexos. Por otro lado no se discrimino por sexo, nivel socioeconómico o grado escolar. Y de cada uno de los pacientes se recolectaron variantes sociodemográficas.

Además se obtuvieron en total 91 controles los cuales fueron individuos psiquiátricamente sanos seleccionados al azar, con sexo indistinto y edades entre 15 y 80 años. Los controles se evaluaron mediante diferentes pruebas o escalas para diferentes trastornos psiquiátricos y así asegurar que no tengan enfermedad psiquiátrica de acuerdo a los criterios del DSM IV. Las pruebas son Test de Fagerström (adicción a nicotina, todos con puntaje= 0), Columbia (Ideación suicida), AUDIT (para dependencia a alcoholismo), Screening Questionare (Tamizaje psiquiátrico) y SLC 90.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica, debido a que dentro del equipo del laboratorio de Genómica de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas del INMEGEN se ha estandarizado el método y se ha visto que se puede obtener mayor concentración de DNA, en sangre periférica en comparación con otro tipo de muestras. Todo se realizó mediante los lineamientos del proyecto “Tamizaje inmunogenético en pacientes con Trastorno Bipolar” (Dictamen aprobatorio comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN, 2014).

### **Procesamiento de las muestras**

Las muestras de sangre fueron congeladas a -20 °C hasta su uso. El DNA de las muestras de sangre se extrajo (aproximadamente 5 ml de sangre), mediante el protocolo de: Wizard Genomic DNA Purification Kit, los pasos fueron los siguientes (estandarizados por el equipo del laboratorio de Genómica de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica; INMEGEN):

1. La sangre periférica se transfirió a un tubo Falcón limpio y etiquetado de 15mL. El sobrante de sangre en el tubo de muestra, se lavó con 3 mL de buffer de lisis RBC (Red blood cells, células rojas de la sangre) y se transfirió al tubo Falcón inicial. Se llevó a un volumen de 10mL con buffer de lisis RBC y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura

ambiente. Transcurrido el tiempo se agitó por inversión y se centrifugó por 15 minutos a 3000rpm a 25°C.

2. Nuevamente se agitó el tubo 3 veces por inversión y se decantó el sobrenadante. El pellet el cual contiene las células blancas de la sangre se resuspendió mezclando vigorosamente durante 5 minutos (o hasta desintegrarse el pellet), utilizando un vórtex.
3. Se agregaron 3mL de buffer de lisis Cell Lysis Solution. La muestra se homogenizó vigorosamente con vórtex. Se incubó a temperatura ambiente por 24 horas o hasta que se desintegró el botón perfectamente, obteniendo una solución homogénea sin grumos.
4. Posteriormente, se agregaron 1.5mL de solución para precipitación de proteínas. La muestra se agitó durante 1 minuto y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 3500rpm a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante se transfirió a un tubo Falcón limpio y etiquetado de 15 mL, al cual se le agregaron 3mL de isopropanol frío. Se mezcló por inversión (50 veces) hasta hacer visibles las hebras de DNA. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 3 minutos a 4000rpm a 8°C.
6. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 3ml de etanol al 70%. Se mezcló por inversión varias veces para lavar el botón.
7. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 4000rpm a 8°C. Enseguida se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente hasta eliminar los restos de etanol, visibles en las paredes del tubo.

8. El DNA se rehidrató con 300mL de buffer de suspensión y se dejó incubar 24 horas a 4°C.
9. Finalmente, el DNA hidratado se transfirió a tubos Ependorf esterilizados y perfectamente etiquetados.

Conforme fue obtenido el DNA fue puesto en congelación a -20 °C, hasta su uso. La cantidad de DNA así como su pureza fueron medidas mediante el equipo espectrofotométrico NanoDrop 2000, los coeficientes de absorbancia para determinar la pureza del DNA fueron 260/280 ~1.8 y 260/230 ~1.8-2.2.

Posteriormente se hicieron diluciones a concentraciones de 50 ng/μl y a 10 ng/μl para lo cual se realizaron los cálculos pertinentes.

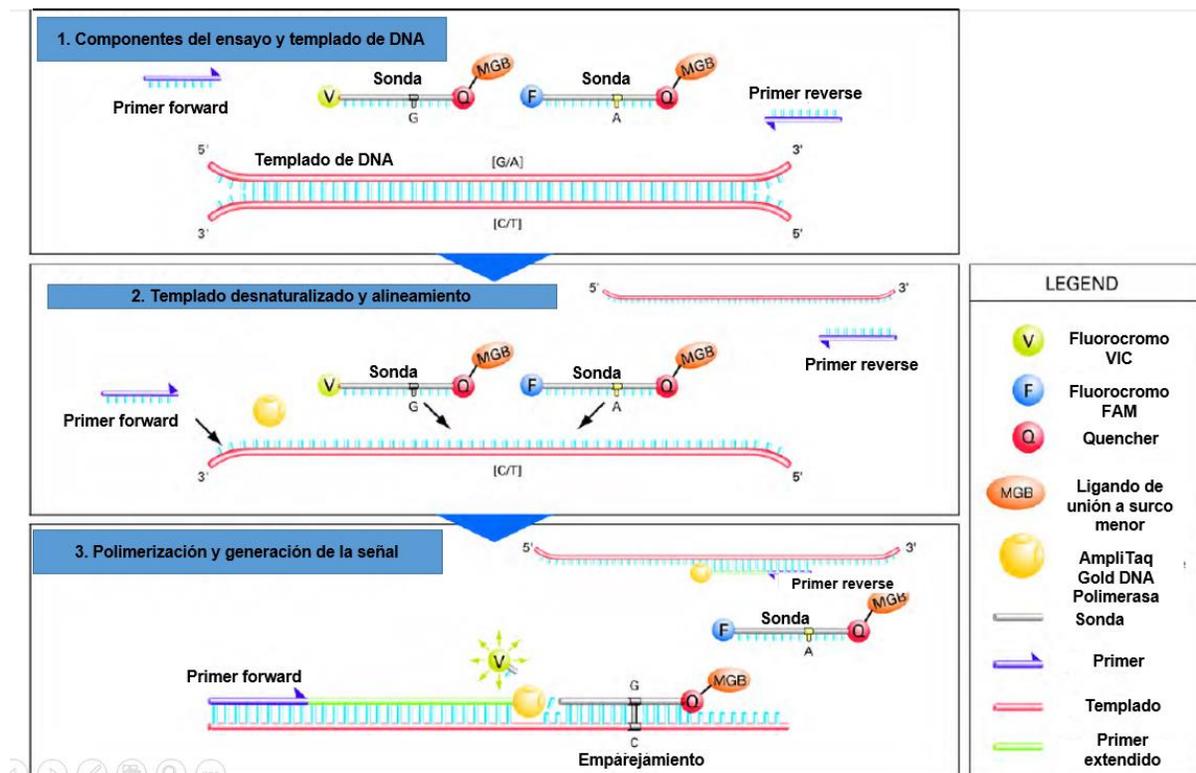
## **Genotipificación**

El análisis de genotipificación se realizó mediante PCR-Real time por ensayos de discriminación alélica de TaqMan Custom SNP Genotyping Assays.

Los ensayos de discriminación alélica usan la química de la DNA polimerasa así como su actividad 5' exonucleasa para amplificar y detectar SNP's específicos en muestras de DNA genómico, cada paquete de ensayo de genotipificación consta de Sondas de ligando a surco menor (Minor Groove Binder, MGB), dichas sondas contienen 2 fluorocromos distintos (VIC y FAM) y además también contiene 2 primers (forward y reverse).

Las sondas TaqMan MGB consisten en un oligonucleótido de blanco específico, el cual es una secuencia contexto (la cual rodea al SNP) y se proporciona en la orientación de la hebra + (5'-3') del genoma, en relación con el genoma de referencia de NCBI. La secuencia contexto posee un fluorocromo reportero en el extremo 5' el cual varía dependiendo del alelo detectable (VIC para el "alelo 1" y FAM para el alelo 2). El extremo 3' posee un apantallador (quencher) no fluorescente que se une a un brazo de unión al surco menor del DNA (MGB) el cual permite el diseño de sondas más cortas al aumentar la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ). Cada

sonda TaqMan MGB se alinea específicamente a la secuencia complementaria entre ambos primers, cuando la sonda está intacta, la proximidad del quencher al fluorocromo reportero suprime la fluorescencia del reportero. Al alinearse y llevarse a cabo la amplificación la actividad 5' exonucleasa de la AmpliTaq Gold DNA polimerasa escinde las sondas que han hibridado con el objetivo. Esta escisión separa el fluorocromo reportero del quencher incrementando la fluorescencia reportera. El mecanismo se ilustra en la figura 7.



**Figura 7:** Pasos y componentes en los ensayos de discriminación alélica llevados a cabo con sondas TaqMan MGB. Tomada y modificada del manual de TaqMan® SNP Genotyping Assays de Applied Biosystems.

Dentro de este diseño experimental se usaron 2 paquetes de genotificación, uno para cada SNP, la información de las sondas usadas se muestra a continuación. Los primers forward y reversen están incluidos dentro del paquete de cada sonda. La descripción anterior fue obtenida del manual de TaqMan® SNP Genotyping Assays de Applied Biosystems.

GEN	RS	VIC	FAM	# CATALOGO	CROMOSOMA (LOCUS)
<b>CHRNA4</b>	<i>rs1044396</i>	A	G	25765540_10	Chr.20:61981134
<b>CHRNA3</b>	<i>rs1051730</i>	A	G	9510307_20	Chr.15:78894339

**Tabla 3:** Datos correspondientes a las sondas utilizadas.

Nota: Los alelos reportados en la literatura son T y C que corresponden a las bases complementarias de VIC y FAM aquí mencionados.

Se usaron placas de PCR de 96 pozos, por pozo se calcularon las cantidades de cada componente de reacción:

Componente	µl por reacción
TaqMan ® Genotyping Master Mix	2.5
Agua libre de nucleasas (ultra pura)	2
20X SNP Genotyping Assay	0.125
Dilución de ADN a 10 ng/µl	3

**Tabla 4:** Cantidad en µl de cada uno de los componentes de reacción de PCR-RT; el TaqMan ® Genotyping Master Mix cuenta con AmpliTaq DNA Polimerasa (forma química modificada de la DNA polimerasa), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y solución buffer con Mg+2. 20X SNP Genotyping Assay cuenta con: sonda, primers forward y reverse y fluorocromo pasivo ROX

Con el fin de hacer control de calidad, al añadir el DNA a los pozos se dejaron espacios estratégicos cada 10 muestras, a los cuales se les agregaron todos los componentes de la reacción excepto DNA. Una vez que cada uno de los componentes de la muestra fueron pipeteados las placas fueron etiquetadas y selladas con un adhesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film).

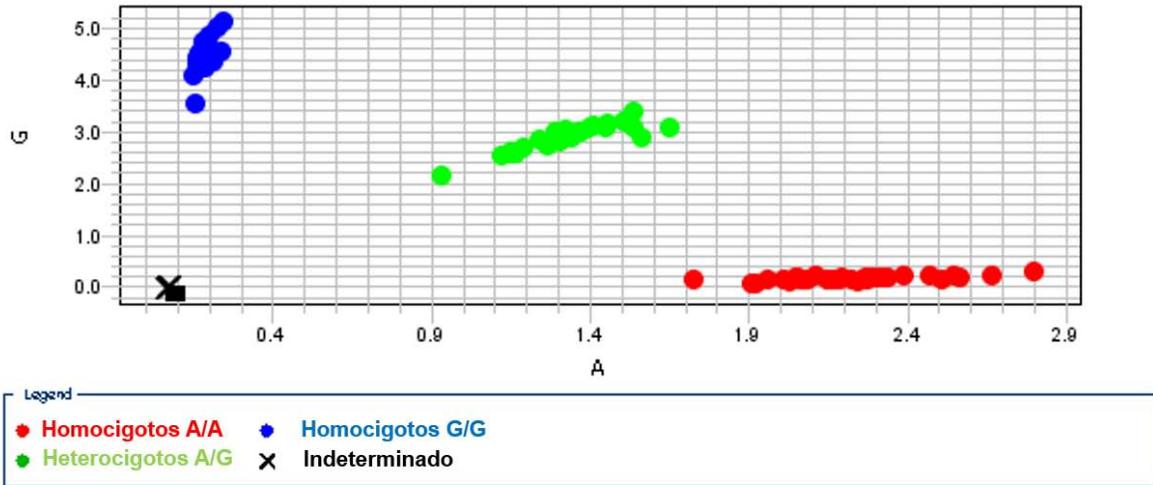
La amplificación se realizó en el termociclador: Quanstudio™ 7 Flex System con las siguientes condiciones de ciclado:

	LECTURA PRE-PCR		CICLADO TÉRMICO		LECTURA POST- PCR
ETAPA	Etapa de espera	Etapa de espera	Ciclado 45 ciclos		Etapa de espera
			Desnaturalización	Alineamiento/Extensión	
TEMPERATURA (°C)	60	95	95	60	60
TIEMPO (MM:SS)	00:30	10:00	00:15	01:00	00:30

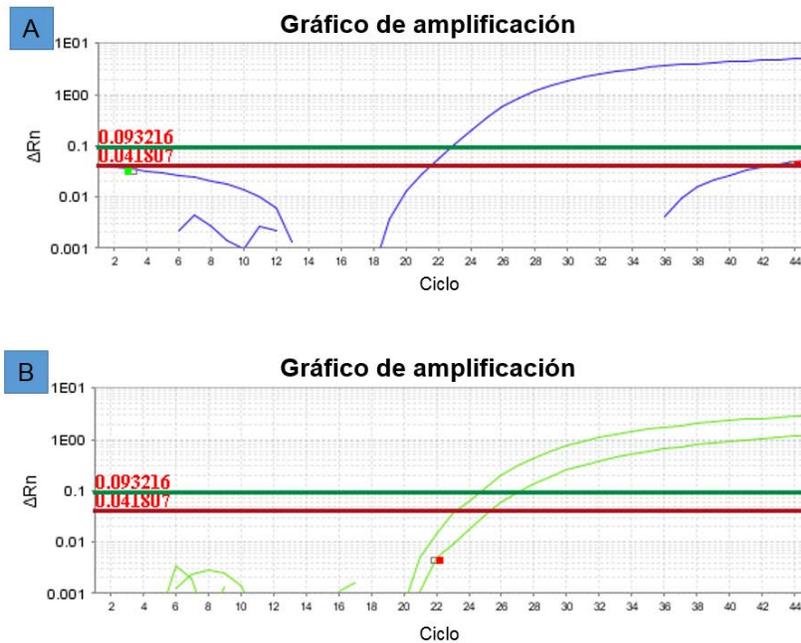
**Tabla 5:** Condiciones de ciclado para la amplificación por PCR-RT

En cuanto a la discriminación alélica se llevó a cabo mediante el software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1. El análisis consistió en observar el gráfico de discriminación alélica generado por el software, el cual es un plano cartesiano en el que grafica uno de los alelos del SNP por eje, se deben encontrar 3 clúster en donde se distribuyen las diferentes muestras de la placa, estos clústeres corresponden a los 3 genotipos posibles (el gráfico de amplificación se ejemplifica en la gráfica 1). Para corroborar el gráfico de amplificación, a la par se observó el gráfico de amplificación de PCR-RT, el cual grafica la fluorescencia ( $R_n$ ) en el eje Y, contra el número de ciclos en el eje X, en muchos casos se grafica el  $\Delta R_n$ , el cual es una normalización de  $R_n$ , en la cual se le resta una "línea de base" que es la fluorescencia de fondo en los primeros ciclos de reacción. También se grafica la línea umbral (Threshold) la cual marca el inicio de la fase exponencial de emisión de fluorescencia, esta línea se establece por arriba de la línea de base, pero lo suficientemente baja para estar en la región de la zona exponencial de la curva de amplificación, además se obtiene el valor de  $C_t$  (ciclo umbral), que es el valor en el que se intersecta una curva de amplificación y una línea umbral. En el caso de ser homocigoto se verá una sola curva, para heterocigotos se verán 2 curvas cercanas entre sí, ver gráfica 2.

Gráfico de discriminación alélica



**Gráfica 1:** Ejemplo de Plot de discriminación alélica obtenido por el software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1 para genotipificación de las muestras en el SNP rs104436 del gen *CHRNA4*, en el eje Y se gráfica el alelo 2, en este caso "G", y en el eje X el alelo 1, en este caso "A". Los puntos representan cada una de las muestras que se agrupan en 3 clústeres según su genotipo.



**Gráfica 2:** Ejemplo de Plot de amplificación obtenido por el software QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1 para genotipificación de las muestras en el SNP rs104436 del gen *CHRNA4*, en el eje Y se gráfica  $\Delta Rn$  en escala logarítmica, y en el eje X número de ciclos. La imagen A es un ejemplo de una curva obtenida para un individuo homocigoto "G"  $C_i=22.831$ . La imagen B representa las curvas para un heterocigoto "A/G",  $C_{iG}=24.606$  y  $C_{iA}=25.371$ . Las líneas horizontales en ambas imágenes representan la línea umbral (línea verde, superior) y línea de base (línea roja, inferior), así como los valores de  $\Delta Rn$  a los que se graficaron.

## **Análisis estadístico**

### **Diferenciación entre fenotipos y características de las muestras.**

Primero con la finalidad de diferenciar entre el fenotipo control y los pacientes con DN y TB-DN se realizó un análisis mediante el lenguaje estadístico R, para lo cual primero se obtuvieron los puntajes del test de Fagerström el cual mide la dependencia física a la nicotina, para una mayor descripción sobre las características del test ver apartado de anexos.

Con el fin de analizar los datos de acuerdo a su distribución, una vez que se obtuvieron los puntajes del test de fagerström, se tomó el puntaje como variable continua y se le aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, el cual se basa en el supuesto de homocedasticidad de varianzas, si se encuentra significancia estadística ( $p_{\text{valor}} < 0.05$ ) se rechaza la hipótesis nula de homocedasticidad de varianzas, lo que indica que los datos no sigue una distribución normal (Correa *et al.* 2006 y Gastwirth *et al.* 2009), entonces se procede a usar estadística no paramétrica debido a que unos de los supuestos para el uso de pruebas paramétricas son: datos distribuidos normalmente y homocedasticidad de varianzas (Rubio Hurtado *et al.* 2012).

Para los puntajes de Fagerström en este estudio se encontró significancia en la prueba de Levene (ver resultados) por lo que posteriormente se procedió a usar estadística no paramétrica, lo que consistió en una prueba de diferenciación de medias de Kruskal-Wallis y una prueba post hoc de Nemenyi. Una vez realizada la diferenciación de fenotipos mediante las pruebas antes mencionadas se usó estadística descriptiva para describir las características generales de las poblaciones.

## Análisis genético

Consistió en calcular las frecuencias alélicas y genotípicas en casos y controles en ambos SNP's.

Para conocer si las frecuencias genotípicas se ajustan al Equilibrio de Hardy-Weinberg así como el estudio de asociación entre casos-controles de ambos SNP's los datos obtenidos fueron analizados mediante el software en línea "DeFinetti", el cual es un software especializado en estudios de asociación genética. Primero para el cálculo de equilibrio H-W el software usa 3 pruebas paralelamente: prueba de  $X^2$  de Pearson (grados de libertad= 1), una prueba de Razón de verosimilitud de  $X^2$  (grados de libertad= 1) y un test exacto de Fisher. Si se encuentra significancia estadística ( $p_{valor} < 0.05$ ) entonces se dice que las frecuencias genotípicas en ese locus no se ajustan al equilibrio de H-W. La validación e inferencias en los estudios de asociación genética depende considerablemente en que las frecuencias genotípicas del grupo control se ajusten al equilibrio HW, de no ser así podría significar que se está violando uno de los supuestos mencionados en el apartado de fundamentos de estudios de asociación genética o en algunos casos puede ser un indicador de sesgos, mala genotipificación o estratificación de la población la cual puede deberse a que la muestra presenta diferentes grupos étnicos que varían en sus frecuencias genotípicas. Una muestra control en equilibrio HW implica que es representativa de la población general y que existe homogeneidad (falta de estratificación de la población significativa) (Salanti *et al.* 2005, Trikalinos *et al.* 2006 y Namipashaki *et al.* 2015).

Para la asociación genética realiza una prueba de  $X^2$  de Pearson, si se encuentra significancia estadística ( $p_{valor} < 0.05$ ) entonces se dice que existe asociación y para cuantificarla realiza el cálculo de los coeficientes Odds Ratio, donde se compara entre alelos y genotipos, y genera modelos de herencia, pero no arroja criterios de selección del mejor modelo de herencia cuando se encuentran valores significativos en más de un modelo (Strom Tim M y Wienker Thomas F. Sitio web: <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Para corroborar los datos de asociación, determinar el mejor modelo de herencia (por medio de correlación logística, debido a que como se ha visto arriba en el apartado de fundamentos de los estudios de asociación genética, el número de copias de un alelo puede modificar el riesgo de la enfermedad) y algunas correlaciones con variantes sociodemográficas donde se ha visto efecto diferencial de consumo (Sexo, edad, escolaridad, nivel de dependencia a la nicotina y el puntaje para las preguntas 1, 2 y 6 del test de fagerström, debido a que el desarrollo de estas preguntas fue con base en el grado de dependencia física a la nicotina) se usó el programa en línea SNPStats desarrollado por el Instituto de Oncología de Cataluña (Solé *et al.* 2006, sitio web: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) para determinar el modelo de herencia el software realiza correlaciones logísticas como las descritas en la tabla 2. Y para decidir el mejor modelo comparara cada modelo con el modelo más general (el co-dominante) mediante la prueba de razón de verosimilitud. La prueba de razón de verosimilitud es una prueba estadística de bondad de ajuste entre dos modelos: compara un modelo relativamente más complejo con un modelo más simple para evaluar si se ajusta mejor a un conjunto de datos. La prueba de razón de verosimilitud compara las puntuaciones de probabilidad de los dos modelos (Solé *et al.* 2006).

La estadística sigue una distribución  $X^2$  con grados de libertad igual al número de parámetros adicionales en el modelo más complejo. Aun así, a veces esta prueba no es suficiente para descartar modelos, y el criterio de información Akaike (AIC) es útil para elegir el modelo de herencia que mejor se ajuste a los datos. Así el modelo con el valor más bajo para el criterio de información Akaike, es el modelo que más se ajusta a los datos, ya que esto corresponde a minimizar la entropía esperada (Solé *et al.* 2006). En el diseño y análisis de las correlaciones no factibles para los programas antes mencionados se usó el software STATA 11.

## Resultados

### Epidemiología

Los niveles de dependencia a la nicotina fueron obtenidos a partir de las escalas generadas por el test de Fageström, las cuales son: muy baja con puntajes de 0-1, baja 2-3, moderada 4-5, alta 6-7, muy alta >8.

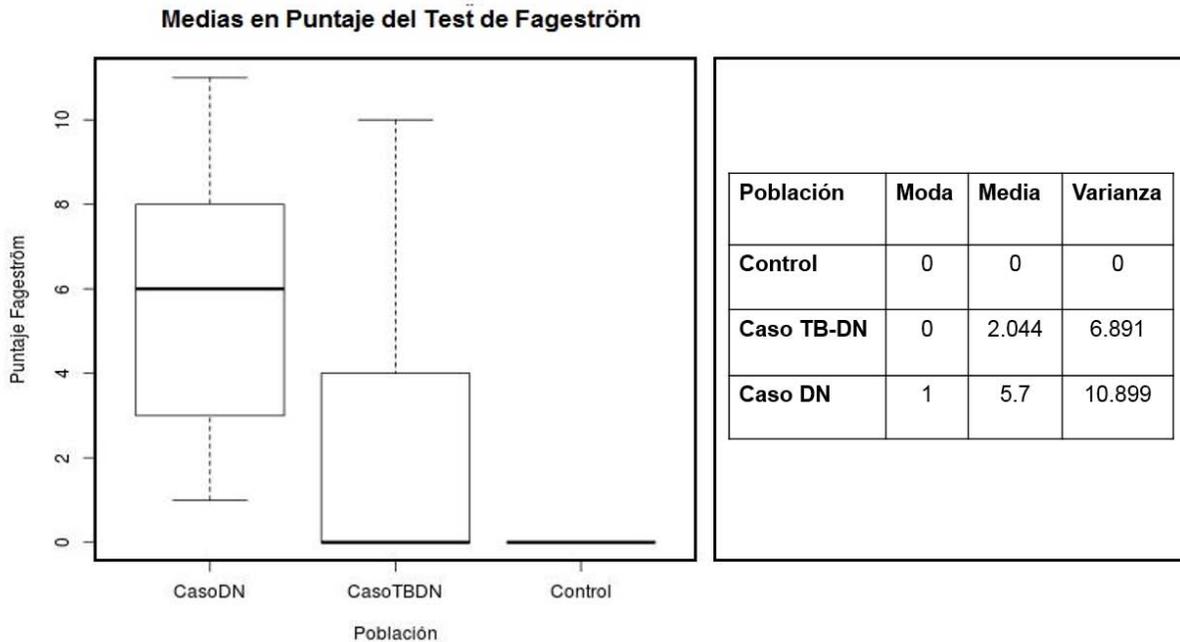
Las poblaciones mostraron los siguientes niveles de dependencia (todos los controles tienen ausencia de dependencia a la nicotina):

Nivel de dependencia	Pacientes con TB-DN	Pacientes con DN
Muy baja	38	17
Baja	9	16
Moderada	12	15
Alta	6	13
Muy Alta	2	35

**Tabla 6:** Niveles de DN en ambas poblaciones de pacientes.

Al dividir a las poblaciones en 3 fenotipos diferentes: Controles sin dependencia, pacientes únicamente con DN y pacientes con TB-DN se graficaron las medias del Test de fagerström.

Como se puede observar en la gráfica 3 la media de los pacientes con DN está muy por arriba de los no dependientes con valores extremos de entre 1 a 11 aproximadamente, sin embargo para los pacientes con TB-DN la media en el nivel de dependencia fue muy bajo y casi al nivel de 0, con valores extremos entre 0 y 10 aproximadamente.



**Gráfica 3:** Izquierda, distribución de las medias en el puntaje del test de Fagerström en las 3 poblaciones. Derecha, medidas de tendencia central y varianzas.

Posteriormente se analizaron las medias mediante un test de Levene el cual mostró que las varianzas del nivel de dependencia no siguen la distribución normal ( $p = < 2.2 \times 10^{-16}$ ), por lo que se realizó una prueba de Kruskal-Wallis encontrándose diferencias significativas ( $p = < 2.2 \times 10^{-16}$ ) en la distribución de las medias debido a esto se asumió que al menos una de las medias es diferente; seguido a esto mediante un estudio post hoc Nemenyi se observó que los 3 grupos difieren por lo que pueden tomarse como fenotipos distintos a pesar de que la medias de dependencia entre pacientes con TB-DN están casi en cero, podría tomarse como un fenotipo “leve de dependencia” resultados de la prueba en tabla 7 anexos.

Una vez que se determinó que existen 3 fenotipos diferentes se procedió a describir las variables sociodemográficas de la población, se tomaron en cuenta aquellas variantes que se encontraran completas o mayoritariamente completas en todas las poblaciones, así como su importancia en la etiología ó características distinguibles en la dependencia a la nicotina y comorbilidad con el trastorno bipolar. Dentro de estas variantes se obtuvieron resultados para edad, sexo y escolaridad las cuales se describen en la siguiente tabla:

Parámetro	Controles	TB-DN	DN
Número de individuos	91	67	97
Mujeres/Hombres Número %	53 / 38 58.24 % / 41.75 %	33 / 34 49.25 % / 50.74 %	35 / 62 36.08 % / 63.91 %
Promedio edad (años) (±SD)	34.23 ± 14.53	38.74 ± 15.22	35.03 ± 14.95
Escolaridad (Promedio años de estudio) (±SD)	14.63 ± 3.34	12.46 ± 3.60	13.51 ± 3.76

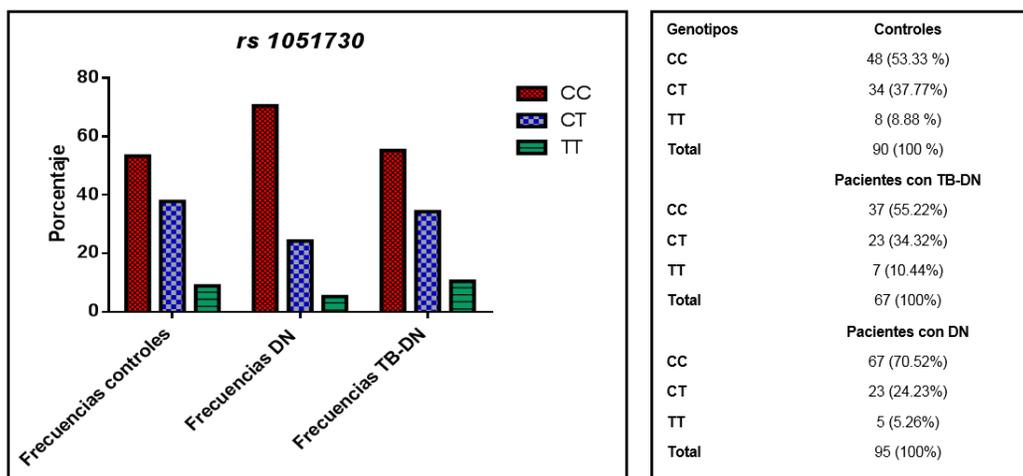
**Tabla 8:** Características generales de cada una de las poblaciones; SD: desviación estándar.

En cuanto a la división por sexo en controles el 58.24 % del total corresponde a individuos del sexo femenino y 41.75 % a individuos del sexo masculino; así respectivamente para pacientes con TB-DN los porcentajes fueron 49.25% y 50.74%; en pacientes con DN fueron 36.08% y 63.91%. La escolaridad mostró ser mayoritariamente superior.

Asimismo para el posterior estudio de asociación mediante correlación logística la edad y la escolaridad fueron divididas en categorías, en el caso de edad tanto las 2 poblaciones de pacientes así como controles fueron categorizados de acuerdo con la división de las cartillas nacionales de salud, no se encontraron individuos pertenecientes a la categoría niños y como afirmación a lo visto en las medias de la tabla anterior, la mayor parte se encontraron en el estrato adulto, tabla de categorías en anexos (Tabla 9, anexos). Por otro lado en la categorización de la escolaridad el mayor porcentaje de individuos fue observado en el estrato de Educación superior (Carrera técnica, universidad, posgrado, especialidad) en controles fue= 70.32%, pacientes con TB-DN= 49.25%, pacientes con DN= 49.48%.

## Genotipificación

Una vez que se describieron las características sociodemográficas de las muestras se procedió a describir el análisis genético. Tras el análisis de discriminación alélica por medio de PCR-RT el número de genotipos obtenidos para el SNP rs 1051730 fue: controles= 90, pacientes con TB-DN= 67 y pacientes con DN= 95. Los individuos se agruparon en tres posibles genotipos 1) Homocigotos CC, 2) Heterocigotos CT y 3) Homocigotos TT. El conteo de genotipos se muestra a continuación. En el SNP rs 1051730 se puede distinguir una tendencia a un mayor número de individuos con genotipo 1 en las 3 poblaciones, sin embargo es más alto en pacientes con DN (Genotipo 1: 53.33% controles, 71.27% pacientes con DN y 55.22% pacientes con TB-DN, gráfica 4).

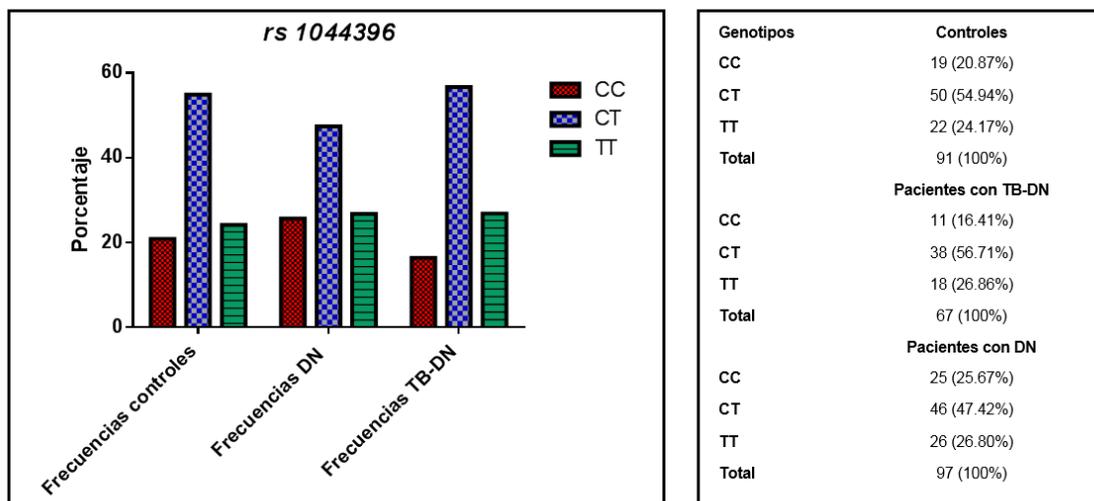


**Gráfica 4:** Izquierda Distribuciones genotípicas de controles, fumadores y bipolares fumadores para el SNP rs1051730. Derecha conteo de individuos por cada genotipo y porcentaje.

Para el SNP rs 1044396 el número de genotipos obtenidos fue: controles= 91, pacientes con TB-DN= 67 y pacientes con DN= 97, gráfica 5.

El genotipo más frecuente para los 3 grupos fue el genotipo 2, además se observa una tendencia, a mayor número de individuos con el genotipo 1 entre controles y pacientes con DN y en el número menor de sujetos con genotipo 1 entre pacientes

con TB-DN y controles, sin embargo se puede observar que la distribución de las frecuencias genotípicas es muy similar para las 3 poblaciones.



**Gráfica 5:** Izquierda Distribuciones genotípicas de controles, fumadores y bipolares fumadores para el SNP rs 1044396. Derecha conteo de individuos por cada genotipo y porcentaje.

Controles y pacientes con DN tienen un valor de n muy próximo para ambos SNP's 90 (rs 1051730) y 91(rs 1044396) para controles y 95 (rs 1051730), 97 (rs 1044396); para pacientes con TB-DN se obtuvieron. A partir del conteo de genotipos se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas como se mostrará a continuación.

Las frecuencias alélicas calculadas mostraron que para el SNP rs1051730 el alelo mayor fue C para los tres grupos (Tabla 10); del mismo modo las frecuencias alélicas calculadas para el SNP rs1044396 mostraron que el alelo mayor para los 3 grupos fue el alelo C (Tabla 11).

Las tablas 10 y 11 muestran que en todas las poblaciones tanto controles como casos para ambos SNP's no hubo evidencia estadística para descartar la hipótesis nula del equilibrio de H-W.

Para el SNP rs1051730 no se encontraron diferencias entre los valores esperados y observados en ninguno de los 3 grupos (Valores de  $p > 0.05$  para equilibrio de H-W; Tablas 10 y 11).

Población	Frecuencias alélicas	Frecuencias genotípicas observadas	Frecuencias genotípicas esperadas	Equilibrio de H-W
<b>Controles</b>	T: 0.2777	CC: 0.5333	CC: 0.5115	$p_p = 0.579158$
	C: 0.7222	CT: 0.3777	CT: 0.3693	$p_{rv} = 0.582421$
		TT: 0.0888	TT: 0.0771	$p_f = 0.600900$
<b>Pacientes con TB-DN</b>	T: 0.2771	CC: 0.5522	CC: 0.5238	$p_p = 0.247557$
	C: 0.7238	CT: 0.3432	CT: 0.4011	$p_{rv} = 0.256227$
		TT: 0.1044	TT: 0.0767	$p_f = 0.234378$
<b>Pacientes con DN</b>	T: 0.1736	CC: 0.7052	CC: 0.6543	$p_p = 0.163482$
	C: 0.8263	CT: 0.2423	CT: 0.3243	$p_{rv} = 0.185935$
		TT: 0.0526	TT: 0.0739	$p_f = 0.163742$

**Tabla 10:** Frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas observadas y esperadas en valor numérico valor de p para el equilibrio de H-W para el SNP rs 1051730 en controles pacientes con TB-DN y DN.  $p_p$ = prueba de  $X^2$  de Pearson,  $p_{rv}$ = prueba de Razón de verosimilitud de  $X^2$ ,  $p_f$ =test exacto de Fisher.

Para el SNP rs1044396 tampoco se encontraron diferencias significativas para rechazar la hipótesis nula de equilibrio de HW (Equilibrio H-W  $p_{valor} < 0.05$ ).

Los resultados antes mencionados se muestran a continuación (Tabla 11).

Población	Frecuencias alélicas	Frecuencias genotípicas observadas	Frecuencias genotípicas esperadas	Equilibrio de H-W
<b>Controles</b>	T: 0.5108	CC: 0.2087	CC: 0.2337	$P_p = 0.339648$
	C: 0.4835	CT: 0.5494	CT: 0.4993	$p_{rv} = 0.339204$
		TT: 0.2417	TT: 0.2666	$p_f = 0.405122$
<b>Pacientes con TB-DN</b>	T: 0.5522	CC: 0.1641	CC: 0.2004	$p_p = 0.229366$
	C: 0.4477	CT: 0.5671	CT: 0.4944	$p_{rv} = 0.227933$
		TT: 0.2686	TT: 0.3049	$p_f = 0.323510$
<b>Pacientes con DN</b>	T: 0.5051	CC: 0.2567	CC: 0.2448	$p_p = 0.612379$
	C: 0.4948	CT: 0.4742	CT: 0.4998	$p_{rv} = 0.612302$
		TT: 0.2680	TT: 0.2551	$p_f = 0.684461$

**Tabla 11:** Frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas observadas y esperadas en valor numérico, valor de p para el equilibrio de H-W para el SNP rs 1044396 en controles pacientes con TB-DN y DN.  $p_p$ = prueba de  $X^2$  de Pearson,  $p_{rv}$ = prueba de Razón de verosimilitud de  $X^2$ ,  $p_f$ =test exacto de Fisher.

También se contrastaron las frecuencias del alelo menor en el total de individuos (255) con las frecuencias de diferentes poblaciones de importancia para la variación de las poblaciones mexicanas derivadas del proceso de mestizaje, las frecuencias fueron obtenidas de la fase 3 del proyecto 1000 genomas.

Para el SNP rs1051730 se observa que las frecuencias son próximas en la población MXL, PUR y CEU (tabla 10), como era de esperarse debido a la ancestría de tales poblaciones.

Para el SNP rs1044396 las frecuencias del alelo menor son similares en la población de estudio y la población MXL, un poco menos próxima a la población CEU y muy diferente a las poblaciones de CHB, PUR y YIR (tabla 12).

Chr	Gen	SNP	Población total	MXL	PUR	CEU	CHB	JPT	YIR
15	CHRNA3	rs 1051730	0.2350	0.1875	0.2308	0.3838	0.0291	0.0192	0.0926
20	CHRNA4	rs 1044396	0.4783	0.4375	0.6250*	0.3788	0.7961*	0.6202*	0.9769*

**Tabla 12:** Frecuencias de los alelos menores en el total de individuos analizados en el estudio, rs1051730 alelo reportado: T, rs1044396 alelo reportado: C (\* casos poblaciones en donde el alelo reportado se comporta como alelo mayor); MXL población con ancestría mexicana residente en Los Ángeles, California; PUR Puertorriqueños; CEU residentes de Utah con ancestría en Europa occidental y del norte; CHB Chinos residentes en Beijing; JPT Japoneses de Tokio; YIR Yorubas de Ibadán, Nigeria.

### Estudio de asociación genética

Una vez calculadas las frecuencias y realizado el cálculo para el equilibrio de H-W se hizo el estudio de asociación el cual reveló que existe asociación únicamente en el polimorfismo rs 1051730 entre pacientes con DN y controles. La prueba de bondad de ajuste de  $X^2$  mostró valores significativos ( $p= 0.02027$ , tabla 12) para la asociación por alelo, donde el alelo T mostró efecto protector con  $OR < 1$  ( $OR= 0.559$   $IC= 0.342-0.917$ , tabla 13); por otro lado se comparó entre genotipos, se encontró significancia estadística y valor de OR de protección para heterocigotos CT sobre homocigotos CC ( $p= 0.03579$ ,  $OR= 0.448$   $IC= 0.266-0.960$ ; Tabla 14 anexos).

Dentro de la misma asociación genotípica se encontró significancia estadística para el modelo dominante CT y TT sobre CC ( $p=0.0209$ ,  $OR= 0.495$   $IC= 0.271-0.902$ ; Tabla 14 anexos) y para la prueba de tendencia de Armitage que es usada para el modelo codominante ( $p=0.02745$ ,  $OR= 0.611$ ; Tabla 14 anexos).

Con estos resultados se observa que el alelo T puede ser un alelo de protección, debido a que los portadores con al menos una copia del alelo T poseen probabilidad de riesgo de 0.559 sobre las personas con alelo C además el genotipo 2 mostró tener efecto de protección contra el genotipo 1, así también el genotipo 2+3 sobre el 1 mostró tener un efecto protector (Tabla 14 anexos). Para el alelo C, se obtuvieron valores significativos en el análisis de asociación por alelo ( $p= 0.02027$ ,

OR= 1.787 IC= 1.091-2.928; Tabla 13) y para la prueba de tendencia de Armitage (p= 0.02745, OR= 1.610; Tabla 14 anexos), con lo cual se observa que el alelo C se comporta como un alelo de riesgo.

**Asociación por alelo SNP rs1051730**

-	T	C
<b>OR</b>	0.546	1.830
<b>I.C</b>	0.332- 0.899	1.113- 3.009
<b>X<sup>2</sup></b>	5.76	5.76
<b>p</b>	<b>0.01643</b>	<b>0.01643</b>

**Tabla 13:** Valores de asociación por alelo para el SNP rs1051730 OR= odds ratio (razón de momios) IC=intervalo de confianza, X<sup>2</sup>= prueba de bondad de ajuste de Chi<sup>2</sup>, p=valor de significancia.

No se encontraron datos de asociación significativos para pacientes con TB-DN ni para ambas poblaciones en el polimorfismo rs1044396 (Tablas 15, 16 y 17 anexos). Por lo que su análisis terminó en este apartado.

Con el fin de corroborar los resultados antes mencionados y determinar cuál el modelo de herencia que mejor se ajusta a este SNP, se llevó a cabo el estudio de asociación en el software en línea SNPStats; se encontró que el modelo de herencia que mejor se ajusta a este caso es el modelo dominante CT y TT (menor valor para el criterio de información de Akaike=254.5) donde tales genotipos poseen un efecto protector con los mismos valores de asociación antes mencionados (OR= 0.48; IC 0.26-0.87; p= 0.016) a continuación se muestra el estudio para cada uno de los modelos de herencia (tabla 18).

Modelo	Genotipo	OR (IC 95%)	P	AIC
<b>Codominante</b>	CC	1	0.054	256.5
	CT	0.48 (0.25-0.92)		
	TT	0.45 (0.14-1.45)		
<b>Dominante</b>	CC	1	<b>0.016*</b>	<b>254.5*</b>
	CT+TT	0.48 (0.26-0.87)		
<b>Recesivo</b>	CC+CT	1	0.33	259.4
	TT	0.57 (0.18-1.81)		
<b>Sobre Dominante</b>	CC-TT	1	0.045	256.3
	CT	0.53 (0.28-0.99)		
<b>Aditivo</b>	-	0.58 (0.36-0.93)	0.022	255.1

**Tabla 16:** Modelos de herencia para el SNP rs1051730, OR= odds ratio (razón de momios) IC=intervalo de confianza, p=valor de significancia, AIC= Criterio de información de Akaike;\* parámetros para discriminar el mejor modelo.

### Correlación con variables sociodemográficas

A partir de los resultados anteriores, se tomó como base el modelo dominante y para conocer el efecto diferencial que podrían ejercer variables sociodemográficas en la plasticidad fenotípica, se realizó una correlación logística por covariables múltiples, sin embargo los datos no fueron significativos por lo que se procedió tomar en cuenta cada una de las variables por separado.

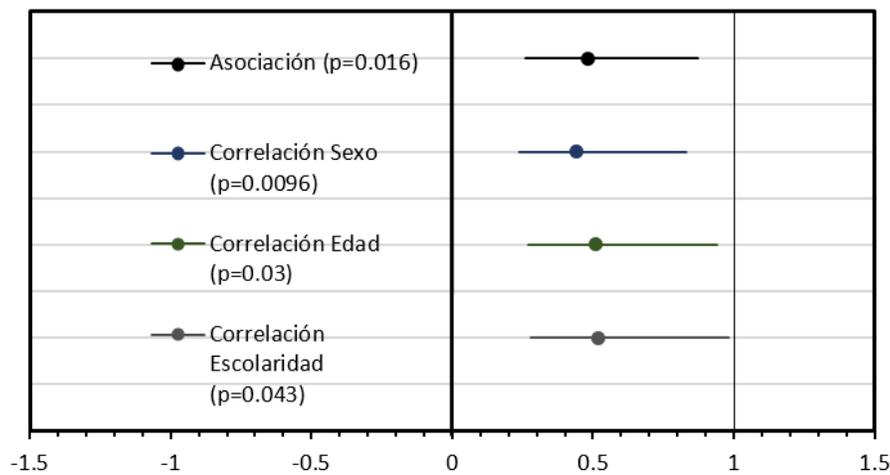
Seguido a lo anterior se inició ajustando por género. Mediante tal variable el OR general bajó a 0.44 (IC= 0.24-0.83; p= 0.0096); a la par se encontró que las mujeres con genotipos CT-TT presentan OR de 0.17 (IC= 0.06-0.51; p=0.02) lo que indica muy baja probabilidad de ser dependiente a la nicotina; en el caso de varones se observó individuos con genotipos CT-TT tuvieron OR de riesgo muy alto de 7.48 (IC= 2.37-23.61; p= 0.02).

Además, también se realizaron correlaciones con variantes como, edad, y escolaridad entre pacientes con DN y controles. Para dichas correlaciones las variantes se tomaron como variables categóricas.

El OR general para la asociación con edad fue de 0.51 (IC= 0.27- 0.94;  $p=0.03$ ) pero al dividir en categorías separadas, ningún rango de edad mostró asociación significativa (Tabla 19 anexos).

La correlación por escolaridad mostró un OR general bajo el modelo dominante de 0.52 (IC= 0.28-0.98;  $p= 0.043$ ), sin embargo, en la separación de los grupos de escolaridad ninguna categoría mostró asociación significativa bajo el modelo dominante (tabla 20 Anexos). En el siguiente gráfico se puede observar la variación del valor de OR en cada una de las covariables antes mencionadas.

Forest plot para correlaciones



**Gráfica 4:** Forest plot para las correlaciones del modelo dominante en individuos con genotipos CT-TT, asociación casos-contróles, correlación con sexo, correlación con edad y correlación con escolaridad; se grafica el valor de OR (Razón de momios) con sus IC (intervalo de confianza).

Después, se realizó una correlación intra grupo en la población de pacientes con DN, donde se analizó la categorización de dependencia. En individuos con los genotipos CT y TT, el grupo que mostró asociación significativa bajo el modelo dominante, fue el nivel de dependencia muy alta (puntajes  $\geq 8$  en el TF) con OR= 1.26 (IC=0.006-2.53;  $p=0.049$ ; tabla 21).

ND	OR (IC 95%)	p
<b>Baja</b>	0.573 (-0.859 - 2.01)	0.432
<b>Moderada</b>	1.268 (-0.315 - 2.852)	0.116
<b>Alta</b>	0.352 (-1.115 - 1.82)	0.638
<b>Muy Alta</b>	<b>1.268 (0.0063 - 2.530)</b>	<b>0.049</b>

**Tabla 21:** Asociación por categorías de dependencia (ND de referencia: 1- Muy baja, tomada por el programa STATA).

Así mismo dentro del TF (Test de Fagerström completo en anexos) existen preguntas indicativas sobre el grado de dependencia, de las que destacan 3 preguntas, para las cuales también se realizó correlación; la primera respecto del tiempo que transcurre al levantarse y fumar el primer cigarrillo, la segunda donde se pregunta si le cuesta trabajo fumar en lugares prohibidos y la sexta, respecto al consumo de tabaco aun en estado de enfermedad. Ninguna de las preguntas mostro datos significativos de correlación (Tabla 22 anexos).

## Discusión.

La etiología del fenotipo de dependencia a la nicotina es multifactorial. En este estudio se llevó a cabo un abordaje de asociación genética con el fin de explicar cierto porcentaje de la enfermedad así como un contraste con algunas variables sociodemográficas, por lo que estos resultados son de carácter probabilístico.

Los datos epidemiológicos arrojaron que el mayor número de individuos de la muestra de casos se encontró en la edad adulta, sin embargo es importante destacar que el consumo de tabaco suele iniciar a edades tempranas en la adolescencia, en este estudio el porcentaje de pacientes jóvenes con dependencia a la nicotina fue de casi el doble de los controles (17.52% DN; 9.78% controles; tabla 9, anexos) sin embargo al realizar la correlación por edad bajo el modelo dominante en individuos CT y TT el OR aumento en 0.03 unidades, lo que podría indicar que la edad funge como factor de riesgo. Al dividir las categorías de edades no se encontró asociación significativa, lo mismo sucedió para escolaridad donde el OR general aumento en 0.04, pero no se encontró correlación entre las categorías por separado.

Al realizar la distinción por sexos es clara la predominancia de individuos del sexo masculino en pacientes con TB-DN y DN en comparación a controles; lo que es comparable con los estudios epidemiológicos de la encuesta nacional de adicciones del 2011, donde se señala que existe mayor porcentaje de hombres consumidores de tabaco.

La interacción genes-ambiente es de suma importancia para el desarrollo de un determinado fenotipo, las condiciones sociales de nuestro país así como la ignorancia en cuanto a los daños por el consumo de tabaco pueden propiciar el consumo (OMS, tabaco, nota descriptiva n° 339, 2014; Plomin Robert, *et al.* 2008). En nuestras sociedades humanas somos muy influenciados por la cultura vigente así como lo que es moralmente correcto o no, o lo que socialmente es bien visto o no; para muchos el consumo significa, copiar actividades observadas (Morris *et al.*

2011), lo que comprende una fuente de interacción genes-ambiente muy importante para la especie humana debido a que el contexto social es de suma importancia para fenotipos de comportamiento, por tal motivo estas variantes poseen gran relevancia a tomar en cuenta para el diseño de estudios de asociación genética que tratan de explicar fenotipos de comportamiento (en este caso el consumo de tabaco) lo que se vio en el ajuste de los OR por edad y escolaridad aun cuando no se encontró correlación en las categorías por separado.

Sobre las características genéticas de las poblaciones estudiadas, en las distribuciones de genotipos para este estudio, fue observado que el SNP rs1051730 tuvo mayor número de individuos con genotipo 1 en pacientes con DN, lo que va de la mano con el estudio de asociación genética del cual se hablará más adelante. Como se vio en la figura 3 (diagrama DeFinetti) existe un rango de variación en la proporción de las frecuencias genotípicas de homocigotos y heterocigotos, sin que estas desvíen el equilibrio HW. Es de suma importancia que en los estudios de asociación genética las frecuencias genotípicas de los controles se ajusten a la hipótesis nula de equilibrio HW, de no ser así podría indicar algún sesgo por tamaño poblacional, estratificación de la población dada por las diferencias genotípicas entre grupos étnicos, o errores de genotipificación (Cacheiro-Martínez, 2011); en este estudio no se encontró evidencia estadística para descartar la hipótesis nula de HW tanto en controles como en casos. Cuando las frecuencias genotípicas tanto de los casos y controles no se desvían del equilibrio de HW nos podría indicar que el modelo genético más apropiado para el locus es el modelo multiplicativo. Este modelo compara los alelos en casos y controles, se basa en el aumento del factor de riesgo "r" para desarrollar una enfermedad, suponiendo que se tienen 2 alelos: A y B donde el factor "r" aumenta por cada alelo B, entonces el riesgo por genotipo sería r para el genotipo AB y  $r^2$  para el genotipo BB (Lewis 2011). El análisis por alelo se plasmó en la tabla 13. En donde se encontraron valores significativos de asociación solo para el SNP rs 1051730. Sin embargo este es un análisis solo por alelo, por lo cual también se realizaron los modelos genéticos por genotipo, el programa DeFinetti no cuenta con las herramientas para poder discernir cuál es el

modelo que más se ajusta a los datos, y dado que en este caso se encontraron valores significativos para el modelo dominante y aditivo, se usó el software SNPStats (como se mencionó en la metodología) el cual mediante el criterio de información de Akaike indicó que el modelo que más se ajusta a estos datos es el dominante, lo cual se ajusta a lo que se ha visto en otras poblaciones de estudio (Loïc Le Marchand *et al.* 2008; Thorgeirsson. *et al.* 2008 y Ping Zhan, *et al.* 2015).

Los estudios de asociación genética comprenden una herramienta muy importante que tiene como objetivo encontrar alelos que predisponen a enfermedades a el nivel de población, el objetivo es correlacionar las diferencias en frecuencia de enfermedad entre diferentes grupos con las diferencias en las frecuencias de un SNP, las frecuencias de dos formas variantes (alelos) de un SNP son el interés primario para la identificación de genes que afectan enfermedad (Cardon. *et al.* 2003). El polimorfismo rs1051730 ha sido vinculado con el desarrollo de DN así como con riesgo de cáncer de pulmón y capacidad de influenciar flexibilidad cognitiva, a pesar de esto dentro de este estudio en las frecuencias genotípicas no se encontró evidencia estadística de que se desvíen del equilibrio HW, como se esperaría para una enfermedad, sin embargo en ocasiones puede mantenerse el equilibrio bajo suposiciones de efectos de selección débiles (Sasieni 1997).

Dentro de este diseño experimental, el único estudio de asociación con resultados estadísticamente significativos fue para pacientes con DN en el SNP rs1051730, alelo T de protección, (tabla 13); con los resultados obtenidos se comprueba la asociación del SNP con la DN en población mexicana.

Del mismo modo al hacer la correlación con sexo, bajo el modelo dominante en pacientes con DN el OR general bajo a 0.44, el OR para mujeres con genotipo CT y TT fue de 0.17 aún más bajo que el general, sin embargo es contrastante que en varones con los mismos genotipos el OR fue de 7.48, a pesar de que el alelo T mostró ser alelo de protección, otros estudios han señalado que los portadores de este alelo requieren mayor cantidad de nicotina para alcanzar el efecto neurobiológico regular, por un lado es difícil que se vuelvan dependientes, pero una vez que lo hacen consumen más tabaco (Berrettini *et al.* 2008) por tal motivo este

podría ser un foco importante de atención para el desarrollo de estrategias de salud, ya que además como se ha mencionado son múltiples los estudios que vinculan el alelo T de este polimorfismo con el desarrollo de cáncer de pulmón, es lógico pensarlo debido a que el mayor consumo de cigarrillos por parte de estos individuos su vez también significa mayor exposición a la nicotina, que se ha visto implicada en la vías celulares de progresión tumoral (Carcereny Enric *et al.* 2010) y a su vez también a sustancias cancerígenas del cigarrillo. Aunado a esto al realizar la correlación mediante la categorización del nivel de dependencia se encontró que bajo el modelo dominante los individuos con genotipos CT-TT y con nivel de dependencia muy alto, mostraron un OR de riesgo (tabla 21), dados estos resultados podría ser de importancia el tomar en cuenta el genotipo con las terapias de reemplazo a la nicotina, ya que es muy importante considerar por ejemplo cuánta nicotina libera el producto de reemplazo y cuanta nicotina está acostumbrado a recibir el paciente (Sansores *et al.* 2002).

La sustitución de base C por T no implica un cambio en aminoácido (NCBI Resource Coordinators, 2016), en este caso este tipo de cambios tienen efectos muy ligeros en la adecuación y debido a que cambios sinónimos no causan cambios en el fenotipo de manera directa (Futuyma 2003), el mecanismo por el cual este SNP confiere protección aún no ha sido elucidado; sin embargo el gen *CHRNA3* dentro del cual se encuentra el polimorfismo rs1051730, se encuentra en proximidad física con los genes que codifican para la subunidad  $\alpha 5$  y  $\beta 4$  dentro del cromosoma 15q24, formando un cluster génico (Raimondi *et al.* 1992) por lo que variantes dentro de estos genes también influyen el efecto de la subunidad  $\alpha 3$ . Por otro lado no siempre que un individuo posee un cambio que está asociado con enfermedad, desarrolla ese fenotipo, esto se conoce como penetrancia, que es la proporción de individuos con la variante que desarrollan el fenotipo, se ha visto que existe penetrancia reducida particularmente para desordenes que siguen un patrón de herencia autosómica dominante, sin embargo en algunos casos también se da en herencia autosómica recesiva y los valores de penetrancia reducida se deben a factores genéticos, ambientales o a factores del estilo de vida que muchas veces

son desconocidos (Cooper *et al.* 2013). Asimismo cuando el cambio de base en un SNP es sinónima puede afectar el fenotipo mediante la tasa de transcripción, o se ha visto que SNP's pueden afectar la transcripción de genes que se encuentren en proximidad (Knight 2005).

Aunque no se encontraron datos significativos para la asociación en pacientes con TB-DN para el SNP rs1051730, otros estudios mencionan que se han encontrado efectos significativos en flexibilidad cognitiva para variantes dentro del cluster  $\alpha 5$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$  sin embargo dentro de estas variantes no se mostraron datos significativos para el polimorfismo rs1051730 (Zhang *et al.* 2010) esto indica que genes codificantes para subunidades de los receptores nicotínicos están vinculadas con procesos cognitivos, debido a esto se puede tener mayor entendimiento de la razón por la cual pacientes con trastornos psiquiátricos poseen elevada prevalencia en consumo de tabaco, en jóvenes con trastornos de la salud mental es de 59% (Lising Enriquez, 2009; Morris *et al.* 2011) aun cuando en esta población el consumo de tabaco por pacientes con TB-DN fue muy bajo.

Respecto a los resultados estadísticamente no significativos, existen algunos criterios a considerar. Como se observó en resultados de las frecuencias tanto alélicas como genotípicas (gráfica 5, tabla 11) fueron similares en los tres grupos en el SNP rs1044396, a diferencia de esto, en el SNP rs1051730 se observó una tendencia, a mayor número de individuos portadores del alelo C y genotipo 1 (gráfica 4, tabla 10), para el SNP rs1044396 desde un principio se vio que las frecuencias eran muy similares en casos y controles por lo que se esperaría no encontrar asociación. Aunado a esto la población de pacientes con TB-DN tuvo una media muy baja de dependencia, por lo que esto también podría ser un factor.

Por otro lado en cuanto al diseño de los estudios de asociación genética hay aspectos a considerar. Se ha visto que las frecuencias alélicas varían ampliamente dentro de las poblaciones, independiente del status de enfermedad; esto se debe a que cada población tiene una historia social y genética así como patrones ancestrales de migración, prácticas de apareamiento, expansiones reproductivas y cuellos de botella. Estas discrepancias están distribuidas a lo largo del genoma e

incluye muchos genes de relevancia médica (Cardon. *et al.* 2003) como los SNP estudiados en este trabajo.

La población mexicana es un grupo de compleja formación. La heterogeneidad en ancestrías podría resultar en falsos resultados de asociación o viceversa (falsos positivos) debido a que los diferentes grupos étnicos pueden variar en sus frecuencias genotípicas (Salanti *et al.* 2005, Trikalinos *et al.* 2006 y Namipashaki *et al.* 2015). Y si el apareamiento no es al azar también puede desviar las frecuencias del equilibrio de HW (Futuyma 2003).

La población mexicana al igual que otros grupos de poblaciones mestizas son un grupo de reciente formación con características variables por región, está conformada principalmente por orígenes ancestrales amerindio, europeo y en menor proporción africano, en este estudio se tomaron en cuenta individuos del centro suroeste de la república por su proximidad geográfica con el fin de disminuir las discrepancias derivadas del complejo proceso de mestizaje de nuestro país y para respaldar esto, en un estudio realizado por el INMEGEN, donde se analizó la diversidad genómica de poblaciones mexicanas, se midieron componentes de ancestría europeo, amerindio y africano; se estudiaron los componentes de ancestría en grupos de mestizos provenientes de los estados del norte del país (Sonora y Zacatecas) centro-costa (Guanajuato, Veracruz y Guerrero) y del sur (Yucatán), se vio que los estados del centro-golfo poseen aproximadamente la misma contribución de componente europeo y amerindio; sin embargo dentro del componente amerindio también fue variable dependiendo de las regiones por ejemplo hacia la zona de la península de Yucatán el mayor de los componentes fue maya (Zolezzi *et al.* 2008) a pesar de estas cercanías en los componentes de ancestría la historia del mestizaje es compleja, como era de esperarse por la posición geográfica, en los estados centrales existió una mayor confluencia de culturas por lo que cabe esperar un mayor flujo génico, sin embargo es posible que algunos lugares conservaran su identidad genética, lo que podría en parte variar los estudios de asociación, debido a diferencias en las frecuencias genotípicas de los grupos. La heterogeneidad en las ancestrías de la población mexicana podría ser

un factor por el cual no se pudo replicar la asociación para la población con TB-DN y para el SNP rs1044396.

Cuando casos y controles tienen diferentes frecuencias alélicas atribuibles a diversidad en el contexto de la población, sin relación con el estado de los resultados se dice que el estudio tiene estratificación de la población (Cardon *et al.* 2003), de cualquier forma la presencia de esta circunstancia por sí sola no es causa suficiente para producir estratificación de la población, por lo que se puede tener una idea errónea de que cualquier diferencia en las frecuencias alélicas se vincula con resultados de asociación falsos (Cardon *et al.* 2003).

Diferentes estudios señalan que existe una amplia gama de factores que se consideran predictores para el consumo de tabaco, entre ellos se encuentran: bajo nivel socioeconómico, escolaridad, factor dentro del cual se ha observado que personas con educación media o inferior poseen más altos porcentajes de consumo en comparación con las personas con educación universitaria (Fernander *et al.* 2011) aunque dentro de este estudio no se encontraron correlaciones significativas por separado en cada una de las categorías de escolaridad, podría encontrarse al usar poblaciones con n más grande para cada una de las categorías.

La raza es otro factor importante, se ha visto que poblaciones amerindias son más propensas al consumo y poblaciones asiáticas y latinas ser menos propensas, sin embargo los resultados varían más específicamente de acuerdo a la región (Fernander *et al.* 2011).

La evidencia estadística para la asociación entre un alelo y un fenotipo viene principalmente de 3 situaciones: el alelo por sí solo puede ser funcional y afectar directamente la expresión del fenotipo, el alelo puede estar correlacionado o estar en desequilibrio de ligamiento con un alelo causal que se encuentre cerca o que la asociación puede ser atribuible a casualidad, confusión o sesgo de selección. Para la asociación del SNP rs1051730 debido a que es un cambio sinónimo puede estar relacionado con que se encuentra en un cluster génico. Por otro lado es imposible que coincidan todas las diferencias genéticas en una población e incluso los intentos para que coincidan tales como la proximidad geográfica, características físicas o

autoreporte de la ancestría de la familia no son suficientes para controlar las diferencias desconocidas en la ancestría de la población (Cardon *et al.* 2003).

## Conclusiones

Se identificaron las frecuencias alélicas y genotípicas para ambos SNP's en población mexicana proveniente del centro-golfo para el SNP rs1051730, donde el alelo mayor en las 3 poblaciones fue el alelo C y el genotipo más abundante fue CC, seguido del genotipo CT y TT.

Para el SNP rs1044396 el alelo mayor fue el T y el genotipo más abundante fue CT, seguido de TT y CC.

Se determinó la asociación del polimorfismo *rs1051730* con dependencia a la nicotina con probable papel protector para el alelo T.

Las características de la población mostraron estar en predominancia en el estrato adulto; en el caso de los pacientes con DN, el porcentaje de jóvenes fue de casi el doble, con predominancia del sexo masculino, lo que se reafirmó en los resultados de correlación por edad, sexo, escolaridad y ND.

Los individuos del sexo femenino con genotipos CT y TT poseen un efecto protector ante el desarrollo de dependencia sin embargo los individuos del sexo masculino con los mismos genotipos mostraron un efecto de riesgo, lo que podría deberse a que requieren un mayor consumo para alcanzar el efecto, siendo así y debido a que el alelo T ha sido clasificado de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón tales individuos poseen mayor riesgo, por lo que podría ser un foco de atención para estrategias de salud para tal problemática.

**Limitaciones:**

Faltan estudios más amplios para replicar la asociación del polimorfismo rs1044396; así como para la asociación con cada una de las categorías de edad y escolaridad en la asociación para el polimorfismo rs1051730.

No se realizaron estudios de ancestría por lo que como perspectiva se sugiere la realización de un análisis de clusterización por marcadores de ancestría.

Para conocer el papel biológico real de los modelos de herencia analizados en este estudio se sugieren estudios en familias.

En el caso de la asociación significativa se desconoce el mecanismo biológico por el cual el cambio de alelo afecta el fenotipo, como se sabe este polimorfismo se encuentra dentro de un cluster génico por lo que otra perspectiva a este proyecto es la realización de ensayos de gen reportero.

## Referencias

- A global reference for human genetic variation, The 1000 Genomes Project Consortium, Nature 526, 68-74, 1 October 2015. Doi:10.1038/nature15393.
- Aedo M. Sócrates, Pavlov Stefanía D, Clavero Francisca C. 2010. Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan? REV. OBSTET. GINECOL. - HOSP. SANTIAGO ORIENTE DR. LUIS TISNÉ BROUSSE; VOL 5 (1): 51-54. Doi: 10.13140/2.1.4654.6886.
- Albuquerque Edson X., *et al.* 1997. Properties of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Pharmacological Characterization and Modulation of Synaptic Function. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 280, No. 3, JPET 280:1117–1136.
- American Psychiatric Association. 2014. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Amos CI. *et al.* 2008. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. Nat Genet; 40:616–22.
- Applied Biosystems. 2014. TaqMan® SNP Genotyping Assays user guide. Life Technologies Corporation.
- Argos Maria *et al.* 2014. Genome-wide association study of smoking behaviors among Bangladeshi adults. J Med Genet; 51(5): 327–333. Doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102151.
- Arneric SP *et al.* 2007. Neuronal nicotinic receptors: A perspective on two decades of drug discovery research. Biochem Pharmacol; 74:1092–1101.
- Benowitz Neal L. Hukkanen Janne, and Jacob III Peyton. 2009. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. Handb Exp Pharmacol. (192): 29–60. Doi: 10.1007/978-3-540-69248-5\_2.
- Benson Dennis A. Karsch-Mizrachi Ilene, Lipman David J. Ostell James and Wheeler David L. 2005. GenBank. Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, Database issue. Doi:10.1093/nar/gki063.
- Berrendero Fernando, Robledo Patricia, Trigo José Manuel, Martín-García Elena y Maldonado Rafael. 2010. Neurobiological mechanisms involved in

nicotine dependence and reward: participation of the endogenous opioid system. *Neurosci Biobehav Rev*; 35(2): 220–231. Doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.02.006.

- Berrettini W., *et al.* 2008. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular psychiatry* 13: 368-373.
- Campbell Neil A. *et al.* 2007. *Biología*. Ed. Médica Panamericana. Séptima edición. pp 458.
- Bertrand Daniel. 2005. The possible contribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in depression. *Dialogues Clin Neurosci*; 7(3):207-16.
- Bierut Laura Jean *et al.* 2007. Novel Genes Identified in a High Density Genome Wide Association Study for Nicotine Dependence. *Hum Mol Genet.* 1; 16(1): 24–35.
- Cacheiro-Martínez Pilar 2011. Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética. Aplicación a un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson (Tesis de maestría). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Caporaso Neil *et al.* 2009. Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One* volume 4, issue 2, e4653.
- Carcereny Enric *et al.* 2010. Blood-based *CHRNA3* single nucleotide polymorphism and outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 68, 491–497.
- Cardon R. Lon, Lyle Palmer. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet* Volume 361, Issue 9357, Pages 598–604.
- Chou IC *et al.* 2003. Association of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit  $\alpha 4$  polymorphisms with febrile convulsions. *Epilepsia* 44:1089–1093.
- Cho Michael H., *et al.* 2014. Risk loci for chronic obstructive pulmonary disease: a genome wide association study and meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2(3): 214–225 doi: 10.1016/S2213-2600(14)70002-5. Ddx.
- Cooper David N. And Krawczak Michael. 2013. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of

- reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* (2013) 132:1077–1130. Doi: 10.1007/s00439-013-1331-2.
- Corominas M., *et al.* 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones. Revisión en *Neurociencia*; 44 (1): 23-31.
  - Correa Juan Carlos, Iral Rene y Rojas Lucinia. 2006. Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. *Revista Colombiana de Estadística* Volumen 29 No 1. pp. 57 a 76.
  - David SP *et al.* 2012. Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in African Americans. *Transl Psychiatry* 2, e119. Doi:10.1038/tp.2012.41.
  - Strom Tim M and Wienker Thomas F. DeFinetti program, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
  - Díaz Jiménez Roxane *et al.* 2012. Impacto del tabaquismo en el trastorno bipolar. *Revista latinoamericana de psiquiatría*; 11:141-155.
  - Doyle Glenn A., *et al.* 2011. In Vitro and Ex Vivo Analysis of *CHRNA3* and *CHRNA5* Haplotype Expression. *PlosOne*. Volume 6, issue 8, e23373.
  - Duncan E., *et al.* 2010. Effects of smoking on acoustic startle and prepulse inhibition in humans. *Psychopharmacology* 156:266-272.
  - Dwyer Jennifer B., *et. al.* 2009. The Dynamic Effects of Nicotine on the Developing Brain. *Pharmacol Ther*; 122(2): 125–139. Doi:10.1016/j.pharmthera.
  - Eun Pyo Hong and Ji Wan Park. 2012. Sample Size and Statistical Power Calculation in Genetic Association Studies. *Genomics & Informatics*; 10(2):117-122.
  - F. Klages. 1968. *Tratado de química orgánica*, volumen 1. Reverte. Ed. LUIS VIVES. España pp 606.
  - Fagerström Karl Olov and Scheider Gina G. 1989. Measuring Nicotine Dependence: A Review of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Journal of Behavioural Medicine*, Vol. 12, No. 2, 1989. Doi: 10.1007/BF00846549.
  - Fernander A., *et al.* 2011. Cigarette smoking interventions among diverse populations. *American Journal of Health Promotion*, Vol. 25, No. 5 supplement.

- Fowler Christie D., and Kenny Paul J. 2014. Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology*; 76(00). Doi: 10.1016/j. neuropharm. 2013.09.008.
- Freathy R., *et al.* 2009. A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) is associated with a reduce ability of women to quit smoking in pregnancy. *Human Molecular Genetics*, 18, 2922-2927. Doi: 10.1093/hmg/ddp216.
- Futuyma Douglas J. 2003. *Evolution*. First edition. Sinauer Associates, Inc. Usa.
- García Sánchez Fernando *et al.* 2011. Inhibición prepulso del reflejo de respuesta de sobresalto en los trastornos neuropsiquiátricos. *Rev Neurol*; 53 (7): 422-432.
- Gastwirth Joseph L. Gel Yulia R. And Miao Weiwen. 2009. The impact of Levene's test of equality of variances on statistical theory and practice. *Statistical science*. Vol. 24 no. 3, 343-360. Doi: 10.1214/09-STS301.
- Genetics home reference. By the U.S National Library of Medicine, CHRNA4, reviewed April 2009.
- Greenwood PM, Fossella JA, Parasuraman R. 2005. Specificity of the effect of a nicotinic receptor polymorphism on individual differences in visuospatial attention. *J Cogn Neurosci* 17:1611-1620.
- Hamilton Matthew B. 2009. *Population genetics*. Primera edición. Wiley-Blackwell, pp 13-16.
- Hancock DB *et al.* 2015. Genome-wide meta-analysis reveals common splice site acceptor variant in CHRNA4 associated with nicotine dependence. *Transl Psychiatry* 5, e651. Doi:10.1038/tp.2015.149.
- Harackiewicz, J. M., Blair, L. W., Sansone, C., Epstein, J. A., and Stuckell, R. N. 1988. Nicotine gum and self-help manuals in smoking cessation: An evaluation in a medical context. *Addict. Behav.* 13: 319-330. Henningfield, J. E. Pharmacological basis.

- Hart Daniel L., And Clark Andrew G. 2007. Principles of population genetics. Cuarta edición. Editorial Sinauer Associates, Inc. Publishers. Estados Unidos.
- Hattersley Andrew T. McCarthy Mark I. 2005. What makes a good genetic association study? Genetic Epidemiology 5. Lancet; 366: 1315–23, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67531-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67531-9).
- He Fang, Li B, Zhao Z, Zhou Y and Hu G. 2014. The Pro-Proliferative Effects of Nicotine and Its Underlying Mechanism on Rat Airway Smooth Muscle Cells. PLoS ONE 9(4): e93508. Doi:10.1371/journal.pone.0093508.
- Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. 1991. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. Br J Addict 86:1119-27.
- Hedrick Philip W. 2005. Genetics of populations. Tercera edición. Editorial Jones and Bartlett publishers. Estados Unidos, pp 61-67, 150-151.
- Hirose S., *et al*, 1999. A novel mutation of *CHRNA4* responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. Neurology 53:1749–1753.
- Hung J. Rayjean *et al*. 2008. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. Nature vol 452. Doi: 10.1030/nature06885.
- Improgo MRD. *et al*. 2010. ASCL1 regulates the expression of the *CHRNA5/A3/B4* lung cancer susceptibility locus. Mol Cancer Res; 8:194–203.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Estadísticas a propósito del día mundial sin tabaco, datos nacionales”, Aguascalientes 31 de mayo de 2013.
- Iniesta Raquela Guinó Elisabet y Moreno Víctor. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit; 19(4):333-41.
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization 2012.

- Kandel Eric. R., *et al.* 2000. Principios de neurociencia. 4° edición. McGraw-Hill interamericana de España.
- Kaprio Jaakko. 2009. Genetic Epidemiology of Smoking Behavior and Nicotine Dependence. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 6:304–306 ISSN: 1541-2555 print / 1541-2563.
- Karp Gerald. 2009. Biología molecular y de la célula. Quinta edición. Editorial Mc Graw Hill. México, pp 559-608.
- Kendler Kenneth S. *et al.* 2015. Smoking and schizophrenia in population cohorts of Swedish women and men: a prospective co-relative control study. *Am J Psychiatry* 172: 11.
- Kent L., *et al.* 2001. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4$  subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 11:37 40
- Kent E. Hutchison *et al.* 2007. *CHRNA4* and Tobacco dependence. *Arch Gen Psychiatry*; 6 4(9):1078-1086.
- Kolb Bryan, Whishaw Ian Q. 2006. Neuropsicología Humana. Ed. Médica Panamericana. 5° edición. España. pp 134-137.
- Knight Julian C. 2005. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *J Mol Med (Berl)*; 83(2): 97–109. Doi: 10.1007/s00109-004-0603-7.
- Kuri Morales Pablo Antonio, *et al.* 2006. Epidemiología del Tabaquismo en México. *salud pública de México / vol.48, suplemento 1.*
- Jasinska Agnes, Zorick Todd, Brody Arthur L. Y Stein Elliot A. 2014. Dual role of nicotine in addiction and cognition: A review of neuroimaging studies in humans. *Neuropharmacology*. 0: 111–122. Doi: 10. 1016/ j. neuropharm.
- Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostrom B, Thun M, Anderson RN, McAfee T, Peto R. 2013. 21st Century Hazards of Smoking and Benefits of Cessation in the United States. *New England Journal of Medicine*; 368(4):341–50.

- Jiménez Ruiz C.A., *et al.* 2008. Vías neurofisiológicas de la dependencia a la nicotina. Oportunidades terapéuticas. *Revista de Patología Respiratoria* 11(2): 67-70.
- Joslyn Geoff *et al.* 2008. Chromosome 15q25.1 genetic markers associated with level of response to alcohol in humans. *PNAS* vol. 105 no. 51.
- L. Abel Ernest. 1986. Marihuana, tabaco, alcohol y reproducción. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España, pp 66-68.
- Le Foll Bernard y George Tony P. 2007. Treatment of tobacco dependence: integrating recent progress into practice. *CMAJ*; 177(11):1373-80.
- Lewin Benjamin. 2008. Genes. IX edición Mc Graw Hill Educación. México, pp 57-59.
- Liechti ME y Markou A. 2008. Role of the glutamatergic system in nicotine dependence: implications for the discovery and development of new pharmacological smoking cessation therapies. *CNS Drugs*; 22:705–724.
- Lising Enriquez Katrina, George Tony P. 2009. Treatment of comorbid tobacco use in people with serious mental illness. *Journal of Psychiatry Neuroscience*, 34(3): E1-E2.
- Loïc Le Marchand *et al.* 2008. Smokers with the *CHRNA* Lung Cancer-Associated Variants are Exposed to Higher Levels of Nicotine Equivalents and a Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamine. *Cancer Res*15; 68(22): 9137–9140.
- Maletic Vladimir and Raison Charles. 2014. Integrated neurobiology of bipolar disorder. *Frontiers in psychiatry*. Doi: 10.3389/fpsy.2014.00098.
- McGehee DS. 2007. Nicotine and synaptic plasticity in prefrontal cortex. *Sci STKE*: e44.
- Ming D. Li *et al.* 2008. Gene-gene interactions among *CHRNA4*, *CHRNA2*, *BDNF*, and *NTRK2* in nicotine dependence. *BIOL PSYCHIATRY* 2008; 64:951-957.
- Morris ChAd D., *et al.* 2011. Multiple perspectives on tobacco use among youth with mental health disorders and addictions. *American Journal of Health Promotion*. Vol. 25, No. 5 Supplement.

- Namipashaki Atefeh, Razaghi-Moghadam Zahra, Ansari-Pour Naser. 2015. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. *Cell J*; 17(2): 187-192.
- National Library of Medicine (United States of America). 2017. Genetics Home Reference. Bethesda (MD): The Library; what are single nucleotide polymorphisms (SNPs)? Consultado: 13 de enero de 2017, sitio web: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>.
- NCBI Resource Coordinators, 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, Database issue D7–D19. Doi: 10.1093/nar/gkv1290.
- Nicotine Dependence Consortium, Center for Genetic Studies, The National Institute on Drug Abuse United States of America, 2007. Consultado: 13 de enero de 2017, sitio web: [https://zork5.wustl.edu/nida/Results/cand\\_genes.htm](https://zork5.wustl.edu/nida/Results/cand_genes.htm).
- Organización Mundial de la Salud, Nota descriptiva n° 310, mayo 2014.
- Organización Mundial de la Salud, tabaco, nota descriptiva n° 339, junio 2014.
- Pérez Rubio Gloria *et al.* 2015. Nicotine addiction development: from epidemiology to genetic factors. *Revista de Investigación clínica*. 67:333-43.
- Petrovsky Nadine *et al.* 2013. The effect of nicotine on sensorimotor gating is modulated by a *CHRNA3* polymorphism. *Psychopharmacology* 229:31-40.
- Ping Zhan, Yong Song, 2015. *CHRNA3* rs1051730 polymorphism and lung cancer susceptibility in Asian population: a meta-analysis. *Translational lung cancer research*, 4(1):104-108.
- Plomin Robert *et al.* 2008. Behavioral genetics. Fifth edition. United States of America, pp 306-333.
- Raimondi E, Rubboli F, Moralli D, Chini B, Fornasari D, Tarroni P., *et al* 1992. Chromosomal localization and physical linkage of the genes encoding the human alpha 3, alpha 5, and beta 4 neuronal nicotinic receptor subunits. *Genomics* 12: 849–850.

- Rempel Nicole, Heyers Sibilla, Engels Hartmut, Slegers Eva and Steinlein Ortrud K. 1998. The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor b2- and a3-subunit genes (*CHRNA2* and *CHRNA3*). *Hum Genet*, 103:645–653.
- Reina D. Ma. Michael D. Scofield Improgo, Tapper Andrew R and Gardner Paul D. 2010. The nicotinic acetylcholine receptor *CHRNA5/A3/B4* gene cluster: Dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog Neurobiol*. 92(2): 212–226.
- Rezvani AH, Levin ED. 2001. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* 49: 258–267.
- Rocha Santos Juliana *et al.* 2015. *CHRNA4* rs1044396 is associated with smoking cessation in varenicline therapy. *Frontiers in Genetics*. Doi:10.3389/fgene.2015.00046.
- Rubio Hurtado María José y Vanesa Berlanga Silvente. 2012. Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. *REIRE*, Vol. 5, núm. 2. Doi:10.1344/reire2012.5.2527.
- Salanti Georgia, Amountza Georgia, Ntzani Evangelia and Ioannidis John PA. 2006. Hardy–Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *European Journal of Human Genetics* 13, 840–848.
- Sansores H. Raúl *et al.* 2002. Tratamientos para dejar de fumar disponibles en México. *Salud pública de México/ vol. 44, suplemento 1*.
- Sasieni Peter D. 1997. From Genotypes to Genes: Doubling the Sample Size. *Biometrics*, Vol. 53, No. 4, pp. 1253-1261.
- Schizhong Han *et al.* 2011. Association of *CHRNA4* polymorphisms with smoking behavior in two populations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet*; 0(4):421-429.
- Secretaria de Salud, Encuesta Nacional de Adicciones 2011.
- Secretaria de Salud, programa de acción: adicciones, tabaquismo, 2001.
- Solé Xavier, Guinó Elisabet, Valls Joan, Iñesta Raquel and Moreno Víctor. 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies.

Bioinformatics 22 (15): 1928-1929. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl268>.

- Soto Mas Francisco. García León Francisco. 2009. La industria tabaquera y la promoción del tabaquismo entre los menores y jóvenes: una revisión internacional. Elsevier España Gac Sanit; 23(5):448–457.
- Stein T et al. 2016. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis, Current Protocols in Bioinformatics, 54:1.30.1-1.30.33. Doi: 10.1002/cpbi.5 web site: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBB#expression>.
- Steinlein, O., Weiland, S., Stoodt, J., Propping, P. 1996. Exon-intron structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-4 subunit (CHRNA4). Genomics 32: 289-294.
- Sullivan Patrick F. Y Kenneth S. Kendler. 1999. The genetic epidemiology of smoking. Nicotine & Tobacco Research 1462-2203/99/\$20051—07.
- S. Numa, M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, Y. Furutani, and S. Kikuyotani. 1983. Molecular Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 48: 57-69, doi: 10.1101/S QB. Doi: 1983. 048.01.008.
- The Tobacco and Genetics Consortium. 2010. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. Nature Genetics 42, 441–447. Doi:10.1038/ng.57.
- Thorgeirsson Thorgeir E., *et al.* 2008. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452, 638-642.
- Toro G. Ricardo. Yepes R. Luis. Palacio. 2010. Psiquiatría. 5° edición. Fondo editorial CIB. 463 páginas.
- Trikalinos Thomas A. Salanti Georgia, Khoury Muin J. Ioannidis John P. A. 2006. Impact of Violations and Deviations in Hardy-Weinberg Equilibrium on Postulated Gene-Disease Associations. Am J Epidemiol (2006) 163 (4): 300-309. Doi: <https://doi.org/10.1093/aje/kwj046>.

- Wang Bingwu *et al.* 2015. Genetic Factors for Enhancement of Nicotine Levels in Cultivated Tobacco. *Nature Scientific Reports*: 5:17360. Doi: 10.1038/srep17360.
- World lung foundation, The tobacco atlas 2015.
- Winterer G., *et al.* 2011. *CHRNA4* Exon 5 genotype affects nicotinic receptor sensitivity and is associated with clinically high-functioning schizophrenia rapid drug treatment-response and superior prefrontal function. In: Paper Presented at the Nicotinic Acetylcholine Receptors, Wellcome Trust Conference.
- Yang Feng *et al.* 2004. A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor  $\alpha$ -4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *Am. J. Hum. Genet.* 75: 112-121.
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA. 2001. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 4: 4 1224-1229.
- Zieher LM. Guelman LR. 2005. Bases neurobiológicas de la adicción a la nicotina. *Psicofarmacología*: 5:30.
- Zinser MC, Pampel FC, Flores E. 2011. Distinct beliefs, attitudes, and experiences of Latino smokers: relevance for cessation interventions. *Am J Health Promot*; 25:eS1–e15. Doi: 10.4278/ajhp.100616-QUAN-200.
- Zolezzi Irma Silva, *et. al.* 2008. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *PNAS*, vol. 106, no. 21, 8611– 8616.

## **Anexos**

### **Equilibrio de Hardy Weinberg**

Con el fin de comprender la influencia de la selección natural, endogamia, deriva génica, flujo génico y mutación en la genética de poblaciones, primero se debe describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población y el patrón de la variación genética a lo largo de las poblaciones (Hedrick 2005). Así en 1908, un matemático inglés (G. H. Hardy) y un fisiólogo alemán (W. Weinberg) formularon independientemente un modelo genético poblacional que lleva sus nombres y ocupa un lugar central en la genética de poblaciones, tal modelo se conoce como el equilibrio de Hardy Weinberg.

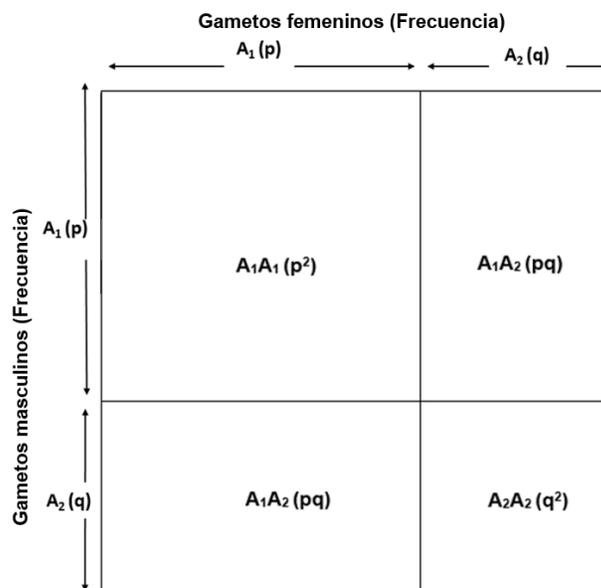
En organismos sexuales los genotipos no son transmitidos de una generación a otra de manera clonal, a diferencia de organismos que se reproducen por fisión binaria. Lo anterior es debido al proceso de meiosis que se lleva a cabo en la formación de los gametos, el cual consta de dos divisiones consecutivas, en la primera división se separan los cromosomas homólogos con lo cual el número cromosómico queda reducido a la mitad, es decir, haploide, donde los alelos se segregan independientemente según la segunda ley de Mendel (Karp. 2009). Así pues se dice que los genotipos son “fragmentados” cuando se lleva a cabo la formación de gametos, por el proceso de segregación y recombinación. Los genotipos se vuelven a restablecer mediante la unión de gametos (Hart et al. 2007). Existe una relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas, debido a esto hay formas de estimar las frecuencias alélicas a partir de las frecuencias genotípicas observadas (Hedrick 2005).

El principio de Hardy-Weinberg dice que después de una generación de apareamiento al azar, en un locus simple, las frecuencias genotípicas puede ser representadas por una función binomial (es el caso de un locus bialélico) de las frecuencias alélicas. Los modelos usados en genética de poblaciones son matemáticos, sin embargo el modelo es poco satisfactorio en algunos casos esto debido a que H-W se basa en la hipótesis de que la población de estudio sea una población ideal, es decir, que cumpla todos los supuestos mencionados en apartado

de fundamentos de los estudios de asociación genética, ya que es incapaz de reflejar todas las complejidades de la situación verdadera (Hedrick 2005).

A pesar de lo anterior, el equilibrio HW es una simplificación de parámetros para describir una población, y es realmente útil para un locus con 2 alelos, ya que permite seguir las frecuencias de un alelo (donde la frecuencia del otro alelo es complementaria) en vez de las frecuencias de 2 genotipos. Así que, en ausencia de factores que cambien las frecuencias alélicas (selección, mutación, deriva génica, flujo génico y mutación) y en la presencia de apareamiento aleatorio, las proporciones genotípicas de Hardy-Weinberg no cambiarían a través del tiempo (Hedrick 2005).

Para ilustrar el equilibrio de H-W se citara el siguiente ejemplo. Asumiendo que una población está segregando para 2 alelos,  $A_1$  y  $A_2$ , en un locus autosómico A, con frecuencias  $p$  y  $q$  ( $p + q=1$ ) respectivamente y asumiendo que gametos femeninos y masculinos se unen al azar para formar cigotos (Hedrick 2005).



**Figura 8:** Proporciones de Hardy-Weinberg a partir de la unión aleatoria de gametos. Tomada y modificada de Hedrick 2005.

Los factores evolutivos más significativos son: selección, endogamia y flujo génico. Así que se dice que las proporciones de Hardy Weinberg son esperadas solo en situaciones en las cuales no hay: selección, apareamiento aleatorio, endogamia o flujo génico. De hecho, la suma de pequeñas cantidades de cualquiera o de estos factores puede modificar ligeramente las proporciones de Hardy-Weinberg o también podría darse el caso de que estos factores estén presentes y la población esté en equilibrio de Hardy Weinberg, por ejemplo algunos casos en los que existe selección puede estar enmascarada por la presencia de endogamia (Hedrick 2005).

Por otro lado, las frecuencias genotípicas son determinadas en parte por el patrón de apareamiento. Para deducir las frecuencias genotípicas bajo la suposición de apareamiento aleatorio se necesita que las frecuencias alélicas no cambien de una generación a otra debido a las fuerzas evolutivas. También se debe de suponer que la población es lo suficientemente grande para que las frecuencias alélicas no estén sujetas a cambios meramente por el error de muestreo. La variación en las frecuencias alélicas propias del error de muestreo en una población es llamada deriva génica aleatoria (Hart et al. 2007).

HW implica que no hay fuerzas evolutivas actuando, en este sentido, el modelo es similar a los modelos de mecánica en física, donde los objetos caen del cielo sin la resistencia del aire o pasan por planos inclinados sin fricción (Hart et al. 2007). EL modelo proporciona una línea de base para la comparación con modelos más realistas en los cuales las fuerzas evolutivas pueden cambiar las frecuencias genotípicas (Hart et al. 2007).

Como se vio en el apartado de Fundamentos de los estudios de asociación genética, para conocer si una población se ajusta al modelo, la prueba de  $X^2$  es la más usada. En la prueba de  $X^2$ , donde el valor de p en este test es la probabilidad de que pudiera producirse una desviación entre los valores observados únicamente por azar. Si la probabilidad es grande significa que solo el azar podría aportar a la desviación. Por otro lado si la probabilidad asociada con el valor de  $X^2$  es pequeña, significa que el azar por sí solo no está vinculado a la desviación (Hart et al. 2007). Sin embargo uno de los problemas que surgen al realizar la prueba es que la población sea muy

pequeña, en estos casos calcular la probabilidad exacta de todas las posibles configuraciones.

En estudios de genética humana desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg en un marcador génico en individuos afectados con una enfermedad genética, podría ayudar a identificar la localización de genes asociados con enfermedad. Desviaciones también pueden significar errores en la genotipificación (Hart et al. 2007).

**Tabla 7:** valores de p para la prueba post hoc de Nemenyi, para las diferencias entre las medias del nivel de dependencia.

-	Casos DN	Caso TB-DN
<b>Casos TB-DN</b>	$3.5 \times 10^{-5}$	-
<b>Controles</b>	$< 2 \times 10^{16}$	$6 \times 10^{-6}$

**Tabla 9:** Número de individuos para cada una de las edades pertenecientes a ambos sexos.

Categoría (edad)	Controles		Pacientes con TB-DN		Pacientes con DN	
	Número de individuos	%	Número de individuos	%	Número de individuos	%
<b>Adolescentes</b>	9	9.78	2	2.98	17	17.52
<b>Adultos</b>	76	83.69	55	82.08	72	74.22
<b>Adultos mayores</b>	6	6.52	10	14.92	8	8.24

**Tabla 14:** Estudio de asociación para el SNP rs1051730, primera parte riesgo del alelo T, OR= odds ratio (razón de momios) IC=intervalo de confianza, X<sup>2</sup>= prueba de bondad de ajuste de Chi<sup>2</sup>, p=valor de significancia, segunda parte riesgo del alelo C.

	Heterocigotos	Homocigotos	Modelo dominante	Prueba de tendencia de Armitage
<b>Riesgo del alelo T</b>				
	[CC]<->[CT]	[CC]<->[TT]	[CC]<->[CT+TT]	OR Común
<b>OR</b>	0.485	0.448	0.478	0.604
<b>C.I</b>	0.254- 0.925	0.138- 1.453	0.261- 0.875	
<b>X<sup>2</sup></b>	4.90	1.86	5.81	5.16
<b>p</b>	<b>0.02685</b>	0.17257	<b>0.01595</b>	<b>0.02306</b>
<b>Riesgo del alelo C</b>				
	[TT]<->[CT]	[TT]<->[CC]	[CC+CT]<->[TT]	OR Común
<b>OR</b>	1.082	2.233	1.776	1.627
<b>C.I</b>	0.314- 3.726	0.688- 7.248	0.552- 5.583	
<b>X<sup>2</sup></b>	0.02	1.86	0.93	5.16
<b>p</b>	0.90015	0.17257	0.33488	<b>0.02306</b>

**Tabla 15:** Asociación para el SNP rs 1051730 pacientes con TB-DN, sin valores estadísticos significativos.

	Asociación por alelo	Heterocigotos	Homocigotos	Modelo dominante	Prueba de tendencia de Armitage
<b>Riesgo del alelo T</b>					
	[C]<->[T]	[CC]<->[CT]	[CC]<->[TT]	[CC]<->[CT+TT]	OR Común
<b>OR</b>	0.992	0.878	1.135	0.927	1.020
<b>C.I</b>	0.602- 1.635	0.444- 1.734	0.377- 3.414	0.491- 1.749	
<b>X<sup>2</sup></b>	0	0.14	0.05	0.06	0
<b>p</b>	0.97409	0.70701	0.82145	0.81410	0.97523
<b>Riesgo del alelo C</b>					
	[T]<->[C]	[TT]<->[CT]	[TT]<->[CC]	[CC+CT]<->[TT]	OR Común
<b>OR</b>	1.008	0.773	0.881	0.836	0.981
<b>C.I</b>	0.612- 1.662	0.246- 2.427	0.293- 2.650	0.288- 2.432	
<b>X<sup>2</sup></b>	0	0.19	0.05	0.11	0
<b>p</b>	0.97409	0.65888	0.82145	0.74242	0.97523

**Tabla 16:** Asociación para el SNP rs 1044396 pacientes con DN, sin valores estadísticos significativos.

	<b>Asociación por alelo</b>	<b>Heterocigotos</b>	<b>Homocigotos</b>	<b>Modelo dominante</b>	<b>Prueba de tendencia de Armitage</b>
<b>Riesgo del alelo T</b>					
	<b>[C]&lt;-&gt;[T]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[CT]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[TT]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[CT+TT]</b>	<b>OR Común</b>
<b>OR</b>	0.956	0.699	0.898	0.760	0.952
<b>C.I</b>	0.638- 1.432	0.341- 1.434	0.394- 2.047	0.385- 1.500	
<b>X<sup>2</sup></b>	0.05	0.96	0.07	0.63	0.05
<b>p</b>	0.82617	0.32808	0.79826	0.42834	0.82428
<b>Riesgo del alelo C</b>					
	<b>[T]&lt;-&gt;[C]</b>	<b>[TT]&lt;-&gt;[CT]</b>	<b>[TT]&lt;-&gt;[CC]</b>	<b>[CC+CT]&lt;-&gt;[TT]</b>	<b>OR Común</b>
<b>OR</b>	1.046	0.778	1.113	0.871	1.051
<b>C.I</b>	0.698- 1.568	0.389- 1.559	0.489- 2.537	0.451- 1.680	
<b>X<sup>2</sup></b>	0.05	0.50	0.07	0.17	0.05
<b>p</b>	0.82617	0.47950	0.79826	0.67959	0.82428

**Tabla 17:** Asociación para el SNP rs 1044396 pacientes con TB-DN, sin valores estadísticos significativos.

	<b>Asociación por alelo</b>	<b>Heterocigotos</b>	<b>Homocigotos</b>	<b>Modelo dominante</b>	<b>Prueba de tendencia de Armitage</b>
<b>Riesgo del alelo T</b>					
	<b>[C]&lt;-&gt;[T]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[CT]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[TT]</b>	<b>[CC]&lt;-&gt;[CT+TT]</b>	<b>OR Común</b>
<b>OR</b>	1.155	1.313	1.413	1.343	1.183
<b>C.I</b>	0.738- 1.807	0.559- 3.084	0.536- 3.725	0.591- 3.052	
<b>X<sup>2</sup></b>	0.40	0.39	0.49	0.50	0.45
<b>p</b>	0.52903	0.53172	0.48366	0.47981	0.50259
<b>Riesgo del alelo C</b>					
	<b>[T]&lt;-&gt;[C]</b>	<b>[TT]&lt;-&gt;[CT]</b>	<b>[TT]&lt;-&gt;[CC]</b>	<b>[CC+CT]&lt;-&gt;[TT]</b>	<b>OR Común</b>
<b>OR</b>	0.866	0.929	0.708	0.868	0.846
<b>C.I</b>	0.554- 1.355	0.438- 1.971	0.268- 1.865	0.421- 1.788	
<b>X<sup>2</sup></b>	0.40	0.04	0.49	0.15	0.45
<b>p</b>	0.52903	0.84759	0.48366	0.70077	0.50259

**Tabla 19:** Asociación por edad (sin niños en el estudio; edad de referencia: adolescentes, tomada por el programa STATA)

Edad	OR (IC 95%)	p
<b>Adultos</b>	1.67 (0.6873-4.0654)	0.257
<b>Adulto mayor</b>	1.504 (0.363-6.234)	0.573

**Tabla 20:** Asociación por escolaridad (escolaridad de referencia: primaria, tomada por el programa STATA)

Escolaridad	OR (IC 95%)	p
<b>Media</b>	0.097 (0.0063 - 1.4820)	0.094
<b>Media superior</b>	0.489 (0.0401 - 5.9580)	0.401
<b>Superior</b>	0.777 (0.0663 - 9.1106)	0.573

**Tabla 22:** Asociación por pregunta (pregunta 1 ítems: 3-1, 3 mayor dependencia, sin individuos con respuesta 2; pregunta 2 ítems: 1-0, 1 dependencia, 0 no dependencia e ítem de referencia tomado por el programa STATA; pregunta 3 ítems: 1-0, 1 dependencia, 0 no dependencia e ítem de referencia tomado por el programa STATA).

	Pregunta				
	1		2		6
<b>Ítems</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>OR</b>	0.444	/	1.857	0.21	0.583
<b>IC</b>	0.11 – 1.78	/	0.28 – 11.90	0.026 – 1.84	0.14 – 2.37
<b>p</b>	0.253	/	0.514	0.16	0.451

## Test de Fagerström

Consiste en un cuestionario de 8 ítems, cuyo objetivo es estimar el grado de dependencia a la nicotina (Fagerström *et al.* 1989). Surge como una manera de evaluar por auto informe el comportamiento compulsivo de dependencia ya que a diferencia de otras pruebas que se basan en que las personas respondan el porqué del consumo como la “Escala de razones para fumar”, el test de fagerström se desarrolló con base en preguntas que no dependen de la interpretación personal de comportamiento, pero que relejan el comportamiento con precisión, es decir, evalúa la auto observación del comportamiento en vez de respuestas introspectivas, las cuales pueden estar enmascaradas por el sistema de creencias de la persona (Fagerström *et al.* 1989) .

Por otro lado no todos los consumidores de tabaco son dependientes a la nicotina, el grado en el cual la nicotina mantiene el control del comportamiento fumador será dependiente en parte de las características del individuo. Un fumador social (aquel que solo lo hace por aprendizaje del comportamiento) podría ser menos dependiente a la nicotina que un fumador que busca cambios en afecto y rendimiento provocados por la sustancia psicoactiva (Fagerström *et al.* 1989).

Las preguntas que condujeron al desarrollo del test de fagerström fueron: ¿qué caracteriza a un fumador dependiente a la nicotina?, ¿puede ser desarrollado un formato de auto informe fácil de administrar? Y se basó en la hipótesis de que dependencia a la nicotina debe estar basada en lo siguiente (Fagerström *et al.* 1989):

- a. Que tan frecuente fue usada la droga (número de cigarrillos por día).
- b. El rendimiento de la nicotina por marca de cigarrillo.
- c. La efectiva utilización de la droga (a través de la inhalación oral).
- d. Que tan pronto y que tasa de la droga es usada dentro de las primeras 4 o 2 después de despertar. Debido a que los niveles plasmáticos de nicotina por la mañana deben ser bajos, lo que posiblemente afecta la búsqueda de nicotina.

- e. El cigarrillo en la mañana. Debería ser reportado como importante debido a su poder para aliviar la respuesta de retirada específica de la nicotina.

De estas suposiciones se construyeron 8 preguntas, tiene puntajes con rango de 0-11, con un puntaje indicativo de la dependencia mínima a la nicotina y puntaje de 11 indicativo de la máxima dependencia (Fagerström *et al.* 1989).

Asimismo existen pruebas bioquímicas que han concordado con los puntajes del test de fagerström, entre ellas al medir la cantidad de monóxido de carbono se correlacionó con resultados significativos hacia los puntajes del test de fagerström (Haraciewicz *et al.* 1988) y así también se ha correlacionado entre los niveles de nicotina plasmática y el puntaje (Fagerström *et al.* 1989). Las preguntas se muestran a continuación, así como la categorización de sus puntajes.

1. ¿Cuánto tiempo pasa entre que se levanta y fuma su primer cigarrillo?

- menos de 5 minutos                      3 puntos
- de 6 a 30 minutos                      2 puntos
- de 31 a 60 minutos                      1 punto
- más de 60 minutos                      0 punto

2. ¿Encuentra difícil no fumar en lugares donde está prohibido, como la biblioteca o el cine?

- si    1 punto
- no    0 punto

3. ¿Qué cigarrillo le molestaría más dejar de fumar:

- el primero                                1 punto
- cualquier otro                            0 punto

4. ¿Cuántos cigarrillos fuma?

- 15 o menos                                0 punto
- de 16 a 25 cigarrillos                   1 punto

- 26 o más 2 puntos

5. ¿Fuma con más frecuencia durante las primeras horas después de levantarse que durante el resto del día?

- si 1 punto

- no 0 punto

6. ¿Fuma aun estando tan enfermo que deba guardar cama la mayor parte del día?

- si 1 punto

- no 0 punto

7. ¿Sueles aspirar el humo de los cigarrillos cuando fumas?

- siempre 2 puntos

- a veces 1 punto

- nunca 0 punto

8. ¿Cuál es el nivel de nicotina de los cigarrillos que sueles fumar?

- 1,3 mg ó más 2 puntos

- de 1,0 a 1,2 mg 1 punto

- 0,9 mg ó menos 0 punto

### Escala de dependencia (Tabla: 23)

ND	Puntaje
Muy baja	0 - 1
Baja	2 - 3
Moderada	4 - 5
Alta	6 - 7
Muy alta	> 8