



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN NEUREXINA 1 (*NRXN1*) Y RECEPTORES NICOTÍNICOS COLINÉRGICOS (*CHRNA3/5*, *CHRN4*) EN LA ADICCIÓN A LA NICOTINA EN FUMADORES LIGEROS Y PESADOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PÉREZ RUBIO GLORIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

COMITÉ TUTOR: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
FES-IZTACALA, UNAM

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., AGOSTO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de marzo de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **PÉREZ RUBIO GLORIA** con número de cuenta 92285301 con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN NEUREXINA 1 (NRXN1) Y RECEPTORES NICOTÍNICOS COLINÉRGICOS (CHRNA3/5, CHRNB4) EN LA ADICCIÓN A LA NICOTINA EN FUMADORES LIGEROS Y PESADOS"** realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. DAVID CRUZ ROBLES
Vocal: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario: DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
Suplente: DRA. LAURA COLIN BARENQUE
Suplente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de mayo de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por haberme permitido continuar con mi preparación académica.

Al CONACYT por haberme otorgado una beca como alumno de doctorado, con número de registro de becario: 225531.

Al Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSIS) por el apoyo otorgado para la realización de éste proyecto, clave: SALUD-2008-C01-87380

A mi Tutora principal, Dra. Martha E. Pérez Rodríguez, por su gran apoyo a lo largo de toda mi formación ya que fue pilar importante para esta etapa de mi vida,, por su paciencia y profesionalismos.

A los miembros del comité tutor: Dr. Federico Ávila Moreno y Dr. José Jesús García Colunga por el apoyo recibido durante la elaboración de éste trabajo, así como por el tiempo invertido y sus conocimientos compartidos.

Agradecimientos

A los miembros de mi jurado, Dr. David Cruz Robles, Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal, Dr. José Jesús García Colunga, Laura Colín Barenque y Dr. Federico Ávila Moreno por su profesionalismo para la mejora de mi tesis y sobre todo en mi formación como futura investigadora.

A los pacientes y familiares, por aceptar colaborar en esta investigación y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, por ser parte de mi vida personal y profesional, sobre todo, al Departamento de Investigación en Tabaquismo y EPOC, así como a sus líderes e integrantes, gracias por su inmenso apoyo. Gracias en especial al laboratorio HLA y todos los que fueron, son y serán parte de él.

A todos mis profesores, compañeros de trabajo, a mis alumnos y colegas que han confiado en mí como profesional y como persona, infinitas gracias.

A mis amigos que han estado conmigo en las buenas, pero sobre todo, en las malas y por su amistad incondicional.

A todos aquellos que han formado parte de mi vida, de forma directa e indirecta, gracias.

“A los fracasos no hay que darles tiempo,
es lo peor que puedes hacer, porque, enseguida
lo impregnan y contaminan todo”

Javier Marías

Agradecimientos

A Gloria Rubio Gutiérrez, por ser mi madre, una mujer inteligente, fuerte, capaz de superar cualquier desafío, eres mi ejemplo a seguir, por ese apoyo incondicional y por todo tu amor, por hacerme una mujer de bien, mi más sincero amor y agradecimiento.

A Ramcés Falfán Valencia, mi esposo, cómplice de vida y de profesión, y por otras muchas cosas, por darme ánimos en los peores momentos y no dejarme caer nunca, por compartir tu vida, gracias por tu amor infinito y por esa confianza. Te amo.

A mis hijos Danna Denisse e Ian Ramcés, son la razón por la cual sigo adelante y por la que trato de ser mejor persona, aunque no siempre puedo, por su comprensión y paciencia, por ser extraordinarios, los amo.

A Victoriano Pérez Muñoz, por tu cariño, por estar a mi lado. Te quiero.

A mis hermanos, Víctor y Susana, por hacerme sentir querida, especial y apoyada. Gracias, los quiero y deseo estar unida para siempre con ustedes.

“Ella camina silenciosamente,
pero, bajo ese aspecto tranquilo,
es toda furia, pura energía eléctrica.”
Judy Grahn.

Índice	
Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Abreviaturas	III
Resumen	1
Abstract	2
1.0. Introducción	3
1.1. Epidemiología	5
1.2. Antecedentes históricos del consumo de tabaco	6
1.3. Formas de uso y componentes del tabaco	8
1.4. Metabolismo de la nicotina	10
1.5. Factores sociales, ambientales y medición de la adicción a la nicotina	12
1.6. Neurobiología de la adicción a la nicotina	14
1.6.1. Generalidades.....	14
1.6.2. Receptores nicotínicos colinérgicos	15
1.6.3. Neurocircuitos de la adicción.....	19
1.6.4. Neurexina	22
1.7. Estudios de asociación genética en la adicción a la nicotina	23
1.7.1. Polimorfismos asociados con adicción a nicotina identificados por estrategia de gen funcional.....	25
1.7.2. SNP en genes relacionados con adicción a nicotina identificados por GWAS.....	26
1.7.3. Abordaje genético de receptores nicotínicos colinérgicos con la adicción a nicotina.....	27
1.7.4. Variantes genéticas en neurexinas asociadas con adicción a nicotina	29
2.0. Hipótesis	32
3.0. Objetivo General	33
3.1. Objetivos Específicos	33
4.0. Metodología	34
4.1. Población de estudio	34
4.1.1. Definición de los grupos de estudio.....	34
4.1.2. Criterios de inclusión y eliminación.	34
4.2. Obtención de material genético.	35
4.3. Diseño del estudio	35
4.3.1. Cálculo del tamaño de muestra.....	35
4.3.2. Etapa 1. Diseño del microarreglo.....	36
4.3.2.1. Selección de SNP asociados previamente con adicción a la nicotina.....	36
4.3.2.2. Selección de SNP etiqueta dentro de regiones genómicas de interés.....	37

4.3.2.3. Selección de marcadores informativos de ancestría (AIMs).....	37
4.3.2.4. Genotipificación por GoldenGate	38
4.3.3. Etapa 2. Selección de polimorfismos genéticos a validar	40
4.3.3.1. Genotipificación por PCR en tiempo real	41
4.4. Análisis estadístico	41
5.0 Resultados.....	43
5.1. Participantes en el estudio.....	43
5.2. Obtención de genotipos, etapa 1	43
5.3. Análisis de ancestría poblacional, etapa 1	43
5.4. Análisis por alelos, genotipos y haplotipos, etapa 1.....	44
5.5. Validación de la etapa 1	49
5.5.1. Selección de SNP para validar en etapa 2.....	49
5.5.2. Obtención de genotipos, etapa 2	49
5.5.3. Resultados de asociación alélica, genotípica y de haplotipos, etapa 2	50
5.6. Análisis in silico	51
6.0 Discusión	54
7.0 Conclusiones.	58
8.0 Literatura citada.....	59
9.0 Anexo 1. Artículo de requisito	67
Suplemento A. Cuestionari de Fagerström.....	81
Suplemento B. Criterios del DSM-IV	82
Suplemento C. Criteros del DSM-5.....	83
Suplemento D. SNP etiqueta incluidos en el microarreglo.....	84
Suplemento E. Marcadores informativos de ancestría incluidos en el microarreglo	93
Suplemento F. Ensayo de genotipificación mediante <i>GoldenGate</i>.....	94
Suplemento G. Discriminación alélica por PCR en tiempo real.....	106

Índice de figuras

1. Metabolismo hepático de la nicotina y principales enzimas que participan en la producción de sus metabolitos.....	11
2. Influencia ambiental y genética sobre el consumo de nicotina.....	12
3. Estructura química de la nicotina y de la acetilcolina.....	15
4. Distribución de los receptores nicotínicos colinérgicos en áreas cerebrales.....	16
5. Representación esquemática de los receptores nicotínicos colinérgicos.....	19
6. Esquema de la técnica de genotipificación masiva modalidad GoldenGate de Illumina.....	39
7. Distribución de los genotipos de los sujetos en estudio, ejemplo para un SNP.....	40
8. Análisis de componentes principales.....	44
9. Valores de OR obtenidos en la etapa 1 en las comparaciones FL vs NF y FP vs NF.....	45
10. Haplotipo generado en el grupo FP vs NF en el cromosoma 15.....	46
11. Obtención de genotipos mediante PCR en tiempo real.....	50

Índice de tablas

1 Subunidades α y β de los receptores nicotínicos colinérgicos en humano, localización cromosómica y productos codificantes de cada subunidad	17
2. Estudios de asociación genética realizados en cromosoma 15	31
3. SNP etiqueta en los genes analizados y cobertura en cada región	37
4. Variables demográficas de los individuos incluidos en el estudio.....	43
5. Índice de fijación (<i>Fst</i>) obtenido entre los grupos de estudio.....	44
6. Etapa 1: Alelos asociados en la comparación FL vs. NF y FP vs. NF	47
7. Etapa 1: Asociación genotípica en los genes <i>NRXN1</i> , <i>CHRNA3</i> y <i>CHRNA5</i> en las comparaciones FP vs. NF y FL vs. NF	48
8. Etapa 1. Análisis de asociación genotípica y alélica entre el grupo FP vs. FL	49
9. Etapa 2: Asociación alélica en las comparaciones FL vs. NF y FP vs. NF	51
10. Etapa 2: Genotipos asociados en los genes <i>NRXN1</i> y <i>CHRNA5</i> a consumo de cigarro.....	52
11. Análisis in silico de posibles miRNAs generados con el rs1882296 de <i>NRXN1</i>	53

Abreviaturas

AIMs,	Marcadores informativos de ancestría.
AOX1,	Aldehído oxidasa 1.
ASA,	Sociedad Americana de Medicina de la Adicción.
ASO,	Oligonucleótidos alelo específico
ATV,	Área tegmental ventral.
CEU,	Caucásicos del este de Europa.
CHRNA3,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad alfa 3.
CHRNA4,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad alfa 4.
CHRNA5,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad alfa 5.
CHRNA7,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad alfa 7.
CHRNB1,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad beta 1.
CHRNB3,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad beta 3.
CHRNB4,	Receptor nicotínico colinérgico subunidad beta 4.
CIGAMOD,	Cigarrera moderna.
CIGATAM,	Cigarrera la tabacalera mexicana.
cpd,	Cigarrillos por día.
CYP,	Citocromo de la familia P450.
DNA,	Ácido desoxirribonucleico.
DRD4,	Receptor de dopamina 4.
DSM,	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales.
ENA,	Encuesta Nacional de Adicciones.
EPOC,	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
FL,	Fumadores ligeros.
FMO3,	Flavin monooxigenasa 3.
FP,	Fumadores pesados.
Fst,	Índice de fijación.
GABA,	Ácido gamma-amino butírico.
GWAS,	Estudios de genoma completo.
INER,	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas.
MAF,	Frecuencia del alelo menor.
miRNA,	micro RNA.
Nac,	Núcleo <i>accumbens</i> .
nAChRs,	Receptores nicotínicos colinérgicos.

NC-IUPHAR,	Subcomité de Receptores Nicotínicos de Acetilcolina de la Unión Internacional del Comité de Farmacología en Nomenclatura de Receptores y Clasificación de Drogas.
NF,	No fumadores.
NMDA,	N-Metil-D-aspartato.
NRXN1,	Neurexina 1
NRXN3,	Neurexina 3.
OMS,	Organización Mundial de la Salud.
pb,	Pares de bases.
PCA,	Análisis de componentes principales.
PCR,	Reacción en cadena de la polimerasa.
RNA,	Ácido ribonucleico.
rs,	Secuencia de referencia.
SLC6A3,	Portador de solutos de la familia 6, miembro 3.
SNP,	Polimorfismos de un solo nucleótido.
TABAMEX,	Tabacos Mexicanos.
TM,	Transmembrana.
UGTs,	Uridin difosfato glucoronosiltransferasas.
VNTR,	Repetidos en tándem de número variable.
ZAP,	Zapotecas del estado de Oaxaca, México.

Resumen

El tabaquismo, hoy en día, es considerado una pandemia, el principal componente del cigarro que ocasiona adicción es la nicotina, para que esta adicción se presente en un individuo, se requiere la interacción de componentes medio ambientales y genéticos. Sin embargo, en la población latinoamericana los datos son escasos. Este estudio se realizó en individuos fumadores, los cuales fueron clasificados según el consumo de cigarrillos por día (cpd) en: a) fumadores ligeros (FL, 1-10 cpd, n=742), b) fumadores pesados (FP, ≥ 20 cpd, n=601); fue incluido un grupo de no fumadores (NF, n=606) clínicamente sanos. Se genotipificaron 384 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), incluyendo los genes *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* y *NRXN1*, mediante el uso de microarreglos. Posteriormente, se llevó a cabo la validación de los polimorfismos que presentaron asociación en la etapa previa. Se realizó un análisis de asociación genética, incluyendo como covariables edad, sexo y contribución ancestral, mediante un modelo de regresión logística. Para predecir la función de los SNP asociados al consumo de cigarro o bien asociados con la adicción a la nicotina, se realizó un análisis in silico. Cinco SNP fueron validados: 2 de ellos localizados en el gen *NRXN1* (rs985919/C y rs1882296/C), mientras que 2 en *CHRNA5* (rs16969968/A y rs17408276/C), los cuales se asociaron con el consumo de cigarrillo. El rs10865246 (alelo C) del gen *NRXN1* (alelo C), se asoció con alta adicción a la nicotina. Por medio del análisis in silico, se observó que el alelo común (T) del rs1882296 (del gen *NRXN1*), forma parte de un miRNA con alta homología con HSA-mir-6740-5p, mientras que, la secuencia que incluye al rs1882296/C (alelo de riesgo) tiene una alta homología con HSA-mir-6866-5. Esto sugiere que, la regulación por miRNAs podría ser diferente en los sujetos portadores del alelo de riesgo, en comparación con los que tienen el alelo común, debido a que los blancos para cada miRNA son diferentes.

Abstract

Aim: To identify genetic variants associated with greater tobacco consumption in a Mexican population. **Methods:** Daily smokers were classified as light smokers (LS, n=742), heavy smokers (HS; n=601), and non-smokers (NS, n=606). In the first stage, a genotyping microarray that included 347 SNPs in *CHRNA2-CHRNA7/CHRNA10*, *CHRNA2-CHRNA4* and *NRXN1* genes and 37 ancestry-informative markers was used to analyze 707 samples (187 HS, 328 LS, and 192 NS). In the second stage, 14 SNPs from stage 1 were validated in the remaining samples (HS, LS and NS; n=414 in each group) using real-time PCR. To predict the role of the associated SNPs, an in silico analysis was performed. **Results:** Two SNPs in *NRXN1* and two in *CHRNA5* were associated with cigarette consumption, while rs10865246/C (*NRXN1*) was associated with high nicotine addiction. The in silico analysis revealed that rs1882296/T had a high level of homology with Hsa-miR-6740-5p, which encodes a putative miRNA that targets glutamate receptor subunits (*GRIA2*, *GRID2*) and GABA receptor subunits (*GABRG1*, *GABRA4*, *GABRB2*), while rs1882296/C had a high level of homology with Hsa-miR-6866-5p, which encodes a different miRNA that targets *GRID2* and *GABRB2*.

Conclusions: In a Mexican Mestizo population, greater consumption of cigarettes was influenced by polymorphisms in the *NRXN1* and *CHRNA5* genes. We proposed new hypotheses regarding the putative roles of miRNAs that influence the GABAergic and glutamatergic pathways in smoking addiction.

1.0. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que el consumo de tabaco ocasiona la muerte de más de cinco millones de personas al año. El 11% de las muertes por cardiopatía isquémica y más del 70% de las muertes por cáncer de pulmón, bronquios y tráquea, tienen como común denominador el consumo de tabaco. Si se mantiene esta tendencia, para el 2030 la OMS estima que el cigarro ocasionará la muerte a más de ocho millones de personas. Esta misma organización indica que, en los hogares más pobres de algunos países en vías de desarrollo (China, India, Pakistán), los productos de tabaco representan hasta el 10% del gasto familiar. Esto muestra la gran importancia que, en esas familias representa comprar cigarro en lugar de cubrir sus necesidades básicas (alimentación, educación y atención a la salud) ¹. En México, se ha observado una tendencia a la alza, en el consumo de cigarro entre los grupos de la población más vulnerables: adolescentes, adultos jóvenes (18 a 25 años) y mujeres, tanto de áreas urbanas como rurales ². Los datos de la Encuesta Nacional de Adicciones de México indican que, entre las razones más importantes para comenzar a fumar está, la curiosidad (56.2%) y la convivencia con otros fumadores (34.5%). El tiempo que tarda un fumador en encender su primer cigarro del día es uno de los indicadores más importantes de adicción, en México, 11.4% de los fumadores activos consumen su primer cigarro durante los primeros 30 minutos después de haber despertado. El 58.4% de los fumadores han intentado dejar de fumar al menos una vez ³. Entre las sustancias que componen el cigarro y que ocasionan adicción se encuentra la nicotina ⁴, en primera instancia afecta al sistema nervioso central, sin embargo, tras consumo crónico, el fumador puede presentar síndrome inflamatorio, lentamente progresivo, que ocasiona daño multisistémico. La adicción a la nicotina se caracteriza por el deseo compulsivo de continuar tomando la droga y obtenerla por cualquier medio. Posteriormente, el individuo consumidor, genera un mecanismo llamado

tolerancia, que se refiere a la necesidad de incrementar la dosis para obtener el efecto placentero que sintió las primeras veces que consumió la droga. Una característica importante de la adicción es el Síndrome de Abstinencia, éste se presenta de manera inmediata tras la suspensión del consumo; síntomas como ánimo depresivo, insomnio, irritabilidad, ansiedad, dificultad de concentración, inquietud, disminución de la frecuencia cardíaca y aumento del apetito, son comunes. El número de cigarros consumidos al día es un buen indicativo para evaluar el grado de adicción a la nicotina ⁵. Se han descrito que, para el desarrollo de la adicción a la nicotina influyen factores genéticos involucrados con las vías de recompensa en el sistema nervioso central, entre ellos se encuentran aquellos que codifican para receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR), receptores de dopamina y serotonina. Estas vías, dopaminérgica y serotoninérgica, están asociadas en los procesos cerebrales de recompensa y placer ^{6, 7}. Mediante estudios de genoma completo, se ha encontrado que, los genes que codifican para neurexina se encuentran asociados en el mecanismo de adicción al cigarro ⁸. Resulta relevante evaluar el componente genético del fumador mestizo mexicano a fin de identificar variantes genéticas asociadas con la adicción a la nicotina en dicha población.

1.1. Epidemiología

El número de muertes anuales a causa del tabaquismo, registradas a nivel mundial, es de casi seis millones de personas. La prevalencia del tabaquismo es del 24%, siendo mayor entre los hombres (40% vs. 9% en mujeres), sin embargo, existe una amplia variación en la distribución por sexo de una región a otra. Latinoamérica presenta la menor diferencia entre las prevalencias de consumo femenino y masculino en adultos, sin embargo, muestra una creciente feminización del mismo; este aspecto es más acentuado en la población de 13 a 15 años^{9, 10}. Datos de la Encuesta Nacional de Adicciones de México en 2011 indican que, en población mexicana de 12 a 65 años de edad, la prevalencia de consumo activo de cigarrillo es de 21.7% (17.3 millones de mexicanos); el 31.4% hombres y el 12.6% mujeres. El 8.9% de la población en este grupo de edad manifestó ser fumador diario (13.2% son hombres y 4.8% mujeres). El 26.4% de la población (21 millones) dijeron ser exfumadores y 51.9% (41.3 millones) declaró nunca haber fumado. Los fumadores diarios, en promedio, inician el consumo a los 20.4 años (hombres a los 20 años, mujeres a los 21.7) y fuman en promedio 6.5 cigarrillos al día (hombres 6.8, mujeres 5.6). Más de la mitad de los pacientes que acuden a pedir informes a los centros de ayuda para dejar de fumar (60%), no se inscriben al programa, entre las principales causas se encuentra: los costos del tratamiento, falta de tiempo por parte de los pacientes o bien la lejanía entre sus hogares o centros de trabajo, y la clínica de ayuda para dejar de fumar. Con relación al éxito del tratamiento para dejar de fumar, reportado como el porcentaje de abstinencia después de un año, fue del 35%³. En México, se observa un aumento en el consumo de cigarrillo entre los adolescentes, adultos jóvenes (18 a 25 años) y mujeres, tanto de áreas urbanas como rurales². El 42.8% de los mexicanos adolescentes entre 13 y 15 años, experimentaron o probaron el cigarrillo alguna vez en su vida (43.2% hombres y 42% mujeres). El 3.7% de los jóvenes fumadores refirió que fumaba en los primeros 30 minutos después de levantarse¹¹. Entre

ellos, no existen motivos personales conscientes para el inicio del consumo, y se acepta como una experiencia casi inevitable en el crecimiento del adolescente ¹², incluso entre los estudiantes del área de la salud, que conocen mejor los daños que ocasiona fumar, las cifras son alarmantes; según la Encuesta Mundial de Tabaquismo en Estudiantes de la Salud de México, realizada a estudiantes de tercer año de medicina y odontología ($\geq 80\%$ entre 19 y 24 años) de universidades públicas, revelan que, la prevalencia de tabaquismo es de 33.3% en estudiantes de medicina y, 43.6% en estudiantes de odontología ¹³. La carga económica que representa el consumo de tabaco al sistema de salud mexicano, por costos de atención médica de las cuatro principales enfermedades asociadas a tabaquismo (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cáncer pulmonar, infarto agudo al miocardio y enfermedad cerebro vascular) se estimó en 43 mil millones de pesos anuales. Esta cifra no estima otro tipo de costos como la muerte prematura, ausentismo laboral o pérdida de productividad ¹⁴.

1.2. Antecedentes históricos del consumo de tabaco

Desde el punto de vista botánico, la familia *Solanaceae* agrupa al género *Nicotiana* que incluye 60 especies, sin embargo, sólo *N. rustica* L (tabaco silvestre) y *N. tabacum* L. (tabaco cultivado) son usadas para la fabricación de productos comerciales ¹⁵. La planta es originaria de la región tropical de América, su uso se remonta a los mayas y aztecas, los cuales la empleaban con fines religiosos, políticos y medicinales, puesto que le atribuían propiedades sanativas en contra del asma, la fiebre, problemas digestivos y de la piel. En 1510, los hombres de Cristóbal Colón llevaron las primeras semillas a España ¹⁶. Dicho traslado cultural alarmó a la Santa Inquisición, por considerar que la expulsión de humo por nariz y boca era un acto demoníaco, merecedor de condenas severas ¹⁷. Para finales del siglo XVI el uso de tabaco se había extendido a casi todos los rincones del mundo, socialmente adquirió aceptación cuando el embajador de Francia Jean Nicot lo recomendó

en forma de polvo, inhalado vía nasal, a la reina de Francia Catalina de Medicis, como remedio contra sus frecuentes e intensas cefaleas. Este evento popularizó el uso de tabaco en la corte francesa y originó el nombre de su principal ingrediente activo, la nicotina ¹⁸. En 1614 Felipe III designó por decreto a la ciudad de Sevilla, como la capital del mundo del tabaco, ordenando que se estableciera la primera gran fábrica. A partir de 1920 las mujeres comenzaron a fumar en público, afirmando la igualdad, emancipación y patriotismo. El primer cigarro con filtro apareció en 1949 como respuesta a la presión de un sector de los fumadores, preocupados por los daños que pudiera ocasionar a la salud la inhalación directa del humo del tabaco. En 1954 se publicó un estudio epidemiológico, realizado por médicos británicos, demostrando la irrefutable asociación entre consumo de tabaco y cáncer de pulmón ¹⁹. Sin embargo, la producción y consumo de cigarros siguió en aumento; a nivel mundial, China es el principal productor, seguido de la India y Brasil ²⁰. En México la comercialización del tabaco se logró hasta 1900 cuando había 743 fábricas que contaban con una máquina Bonsack, capaz de producir 120 mil cigarros diarios. Para 1972 se establece la empresa Tabacos Mexicanos (TABAMEX), encargada de regular la producción, manipulación y procesamiento del tabaco, por tanto, formalizaba contratos con campesinos y fabricantes, donde se estipulaban las cantidades de cada tipo de tabaco, el precio, las prácticas agronómicas a seguir, los costos del financiamiento, asesoría para manejar el cultivo, el uso de instalaciones para el secado del tabaco, etc. Dichos acuerdos prevalecieron hasta principios de los años noventa, cuando TABAMEX privatizó sus activos para integrarse a las grandes tabacaleras nacionales ²¹. Actualmente, la industria tabacalera mexicana funciona como un duopolio manejado entre CIGAMOD (cigarrera la moderna) y CIGATAM (cigarrera la tabacalera mexicana), es cultivado en Nayarit, Veracruz, Chiapas y Jalisco ²².

1.3 Formas de uso y componentes del tabaco

Los productos de tabaco de uso generalizado y producción industrial se derivan de tres tipos de preparación: tabaco para fumar (cigarro), pipas (incluidas pipas de agua), preparaciones orales para mascar y mantener en la boca o para colocar en la nariz (rapé, “snus”, nuez de betel); algunos forman parte de la cultura y tecnologías regionales, mientras que otros son mundiales. Los cigarrillos son los productos más estudiados y los más consumidos en nuestro país ²³; además de la nicotina, contienen más de 4000 sustancias químicas que aparecerán en el humo de la combustión, el cual se divide en: fase gaseosa y fase sólida. Algunos de los componentes en fase gaseosa son, dióxido de carbono, acetona, acetonitrilo, amoníaco, metano, propano, piridina, propionaldehído, etc. En la fase sólida se encuentra nicotina, anilina, benzopireno, naftalina, fenol, pireno, quinolona, entre otros. De los componentes anteriores, se observan variaciones cuantitativas debido a características del propio cigarrillo, tipo de filtros, uso de fertilizantes, etc. La combustión del tabaco origina dos corrientes: la principal, que el fumador mediante aspiración lleva hasta sus pulmones y la secundaria, que es la que inhala el fumador pasivo. La absorción de los componentes depende del pH y de la solubilidad, así los elementos más solubles se absorben en vías superiores mientras que los de baja solubilidad se absorben a nivel alveolar. La mayoría de los cigarrillos comerciales contienen 10 mg o más de nicotina, de la cual se inhala entre 1 y 2 mg por cigarro, en el humo del cigarro está principalmente en forma de sales ácidas, por lo que su absorción es a nivel pulmonar ²⁴. Con el paso del tiempo, la industria tabacalera ha dirigido sus campañas publicitarias a las poblaciones más vulnerables, esto originó en los años 50’s la comercialización de los cigarrillos mentolados, su consumo ha ido en aumento, en Estados Unidos se tiene reportado que, aproximadamente el 27% de los fumadores consume este tipo de producto ²⁵, los cuales son más adictivos porque, el mentol disminuye los efectos aversivos que un fumador novato

podría sentir, es decir, el consumidor inicial tiene una sensación de frescura. El mentol es un modulador alostérico negativo, modifica la sensibilidad de los receptores nicotínicos de acetilcolina ^{25, 26}. Otro tipo de productos comercializados son los cigarrillos regulares, ligeros y ultra ligeros, esto lo hicieron las compañías tabacaleras con la idea de vender productos “menos nocivos”, los consumidores de estos productos presentan, en orina, la misma cantidad de carcinógenos [1-hidroxioreno y 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol] y cotinina que aquellos consumidores de cigarrillo convencional ²⁷. La forma de consumo de nicotina más novedosa, cuyo uso va en aumento, es el cigarrillo electrónico. Una encuesta realizada en 2009 y repetida en 2010 en población caucásica reveló que, el consumo de cigarrillo electrónico pasó de 0.6 a 2.7% ²⁸. Los fabricantes suelen venderlo como una forma de tratamiento para dejar de fumar, sin embargo, la OMS no lo considera como tal, pues su eficacia no ha sido demostrada. Este dispositivo se encuentra fabricado de acero inoxidable, tiene una cámara con nicotina líquida en diferentes concentraciones, es alimentado por una batería recargable y se parece a un cigarrillo convencional, además, contiene propilenglicol, glicerina, saborizantes, nitrosaminas y dietilenglicol. El vapor contiene formaldehído, acetaldehído, acroleínas y metales pesados (níquel, cromo, plomo) ^{29, 30}; además produce pequeñas partículas, similares a las que origina el cigarrillo convencional, que se depositan en el epitelio aéreo ³¹. Existe evidencia, en cultivos celulares de células epiteliales humanas, de que el uso del cigarrillo electrónico afecta la inmunidad innata, ya que se observa mayor probabilidad de tener infección por rinovirus humano y potencia la respuesta inflamatoria (en este estudio se observa un aumento en la expresión de IL-6 e IL-8) ³². Hoy en día, la OMS considera que, todos los productos derivados del tabaco y/o que contengan nicotina son nocivos para la salud y altamente adictivos. No deben escatimarse los esfuerzos para rechazar todas sus formas de uso.

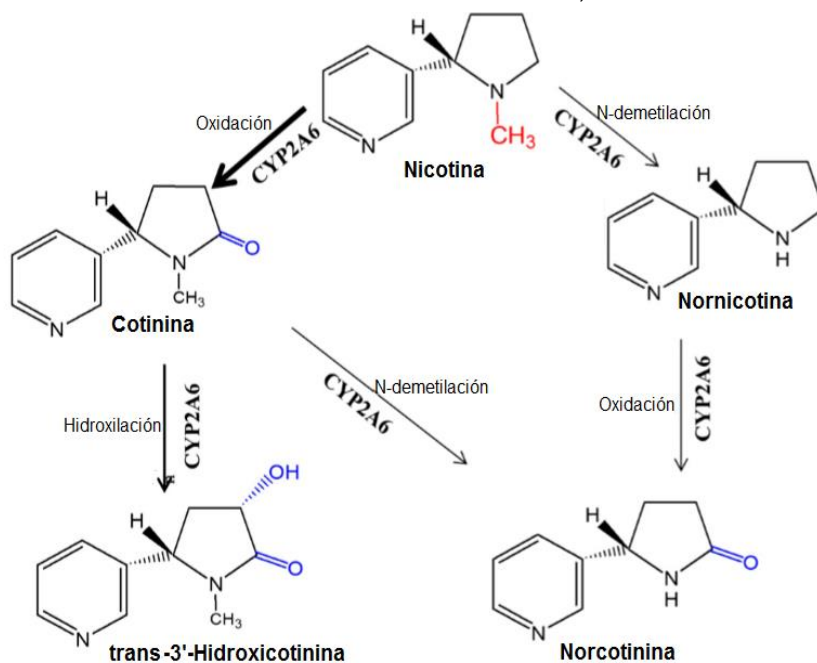
1.4. Metabolismo de la nicotina

La nicotina es una droga psicoactiva, es el principal alcaloide del tabaco (95%), le sigue la nornicotina, anatabina y anabasina, otros alcaloides se encuentran en menores cantidades, ya que se forman durante el procesamiento de la planta, algunos de ellos son miosmina, N'-metilmiosmina, cotinina, nicotirina, nornicotirina, N'-oxido nicotina, 2, 3'-bipiridil y metanicotina ⁴. La absorción de la nicotina, a través de las membranas biológicas depende del pH, es una base débil ($pK_a=8.0$) de naturaleza lipofílica, en la mayoría de los cigarrillos (tabaco curado), se encuentra ionizada (pH 5.5-6.0), como consecuencia hay poca absorción a nivel bucal, cuando el humo del tabaco llega a los alvéolos pulmonares, es rápidamente absorbida, esto presumiblemente por la enorme superficie alveolar, así como el pH casi neutro (7.4) del microambiente pulmonar, posteriormente entre el 80% y 90% de la nicotina inhalada es absorbida y 10 segundos después llega al cerebro; la nicotina usada en pipas, para mascar, en parches transdérmicos, para inhalar o en tabletas sublinguales se encuentra en pH de 6.5 o más, como consecuencia la nicotina se encuentra no ionizada, facilitando su absorción a nivel bucal, sin embargo, el tiempo que tarda en llegar a cerebro es mayor. La absorción a nivel de estómago es escasa, debido al pH ácido del medio, a nivel de intestino delgado es bien absorbida debido a la gran superficie ³³. Cuando la nicotina entra a la circulación sanguínea, donde el pH es de 7.4, cerca del 69% se encuentra en forma ionizada y 31% en forma no ionizada, el 5% se une a proteínas plasmáticas, tiene alta afinidad por cerebro, hígado, bazo, riñón y pulmón ³⁴. La nicotina se acumula en el jugo gástrico y saliva, es capaz de atravesar la placenta y acumularse en el líquido amniótico ³⁵. Tiene un tiempo de vida media de 2 horas en plasma, al fumar un cigarrillo rápidamente alcanza la circulación venosa, pasa a ventrículo izquierdo, posteriormente llega a circulación arterial sistémica y a cerebro. La concentración de nicotina arterial después de fumar un cigarrillo llega entre 20 y 60 ng/mL ³⁶. El 70 a 80% de la nicotina que entra en el

organismo humano se metaboliza en el hígado, en donde experimenta reacciones de oxidación, principalmente por CYP2A6 y CYP2B6 y en menor proporción por CYP2D6, CYP2E1 Y CYP2A13 (figura 1), y por la enzima citosólica aldehído oxidasa 1 (AOX1) para formar cotinina. Entre el 4% y 7% del alcaloide se metaboliza a N'-óxido nicotina mediante la enzima que se encuentra en los microsomas de las células hepáticas, denominada flavin monooxigenasa 3 (FMO3). Cerca del 3% al 5% de la nicotina es glucoronidada en los microsomas hepáticos por uridin difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) para producir (S)-nicotin-N-b-glucoronido. Entre los metabolitos minoritarios encontrados en orina está la nornicotina (1%) cuya producción es a partir de nicotina o cotinina mediante citocromo P450

37.

Figura 1. Metabolismo hepático de la nicotina y principales enzimas que participan en la producción de sus metabolitos. Tomada de Earla, 2014 ³⁸



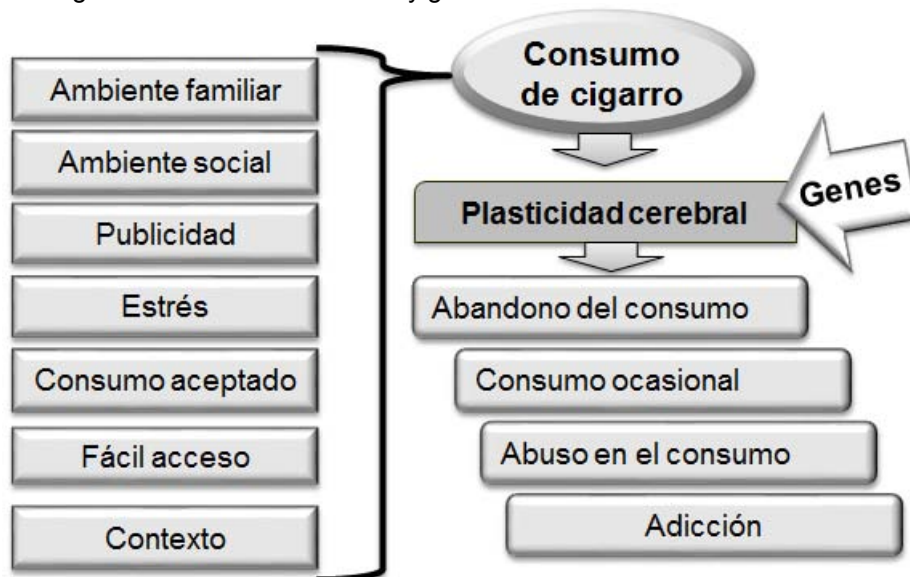
La nicotina es excretada por filtración glomerular y secreción tubular con una reabsorción variable dependiendo del pH. En orina ácida, la nicotina es principalmente ionizada y la reabsorción tubular es mínima, en orina alcalina, una gran parte de la nicotina se encuentra

no ionizada permitiendo una reabsorción tubular, se han encontrado niveles bajos de nicotina después de 11 h. En heces se ha detectado nicotina hasta 72 horas después de haber fumado, la nicotina y cotinina se pueden eliminar en el sudor, sin embargo, los niveles no se comparan con los de la vía urinaria ³⁹.

1.5. Factores sociales, ambientales y medición de la adicción a la nicotina

Por lo general, la decisión inicial de consumir una droga es voluntaria, pero existen múltiples factores asociados al entorno del individuo que, contribuyen a que se deje de consumir la droga, o bien a que se mantenga este consumo en diferentes grados hasta que, posteriormente, se convierte en una enfermedad cuando, la capacidad individual para ejercer el auto control se vuelve sumamente deficiente (figura 2). Según la Sociedad Americana de Medicina de la Adicción (ASA), la adicción es una enfermedad crónica del cerebro; afecta la motivación, la memoria y los circuitos cerebrales relacionados con el placer ^{40, 41}.

Figura 2. Influencia ambiental y genética sobre el consumo de nicotina.



La adicción se caracteriza por: a) incapacidad de abstenerse del consumo, b) deterioro de la conducta, c) anhelo por consumir la droga (*craving*), d) disminución en el reconocimiento de los problemas relacionados al consumo y e) respuesta emocional disfuncional (incremento de ansiedad y disforia). Es progresiva y puede ocasionar muerte prematura. Es una enfermedad donde además de los factores genéticos participan aspectos personales (cognición, emociones), capacidades personales y medio ambiente ^{40, 41}.

La adicción genera un mecanismo llamado tolerancia, que se refiere a la necesidad de incrementar la dosis para obtener el efecto que se tenía en un principio del consumo; este mecanismo se presenta porque, la nicotina es capaz de elevar los umbrales de recompensa en el cerebro ⁴². Una característica importante de la adicción es el Síndrome de Abstinencia, se presenta de manera inmediata tras la suspensión del consumo, síntomas como ánimo depresivo, insomnio, irritabilidad, ansiedad, dificultades de concentración, inquietud, disminución de la frecuencia cardíaca y aumento del apetito son comunes ^{43, 44}. Después de la abstinencia aparece, a corto, mediano o largo plazo el *craving*, este es el responsable de las dificultades asociadas a la abstinencia y del alto nivel de recaídas ⁴⁵. La mayoría de los programas de tratamiento para dejar de fumar cuentan con estrategias destinadas al manejo de este impulso incontrolable ⁴⁶.

Para evaluar la adicción a la nicotina, la herramienta más empleada a nivel mundial por su precisión, reproducibilidad y facilidad para aplicar es el cuestionario de adicción a la nicotina de Fagerström (suplemento A), está compuesto de 6 preguntas, la puntuación va de 0 (adicción leve) a 10 (adicción grave), permite clasificar la adicción sin tomar en cuenta los trastornos psiquiátricos asociados al fumador, particularmente depresión y ansiedad ⁴⁷. Entre las limitantes de dicho cuestionario se encuentra que, no evalúa la dificultad de control de uso del tabaco ni los intentos fallidos por dejar de consumir el cigarro ⁴⁸. La Asociación Americana de Psiquiatría, en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos

Mentales (DSM) establece otros criterios, ampliamente usados por los especialistas, para evaluar y clasificar el grado de adicción a la nicotina y que les permite correlacionarlos con psicopatologías como depresión y ansiedad ⁴⁹. La versión cuatro del DSM indica que, un individuo con adicción a la nicotina debe presentar 3 o más de los 7 criterios que se mencionan en el suplemento B por 12 meses o más ^{50, 44}. La versión cinco del DSM fue publicada en mayo de 2013, entre los nuevos criterios que se establecen para el estudio de la adicción a la nicotina es, considerarla dentro del apartado de, desorden relacionado a uso de sustancias. La adicción es clasificada en leve (presencia de 2 a 3 criterios), moderada (presencia de 4 o 5 criterios) y severa (presencia de 6 o más) (suplemento C), siempre y cuando estos criterios se presenten durante 12 meses o más ^{50, 51}. Los cigarrillos consumidos por día (cpd) es una medida indirecta del grado de adicción a la nicotina. Es ampliamente utilizada en los estudios de asociación genética por su fácil aplicación y porque los médicos usan este criterio para estimar los riesgos a la salud por dicho consumo ⁵². En población afroamericana se ha observado el mismo patrón de consumo que en la población hispana, es decir, un consumo de 1 a 10 cpd corresponde a una puntuación inferior a 3 en el cuestionario de Fagerström ⁵³.

Entre las limitantes de los criterios para evaluar el grado de adicción se encuentra que no capturan la forma de consumo de cigarrillo (topografía del consumo), es decir, el número, volumen, duración, velocidad, etc. de la inhalación o bocanada al cigarrillo ⁵⁴.

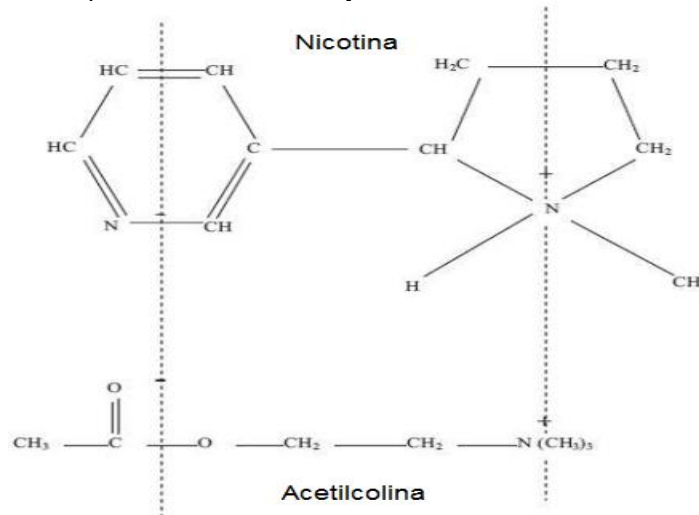
1.6. Neurobiología de la adicción a la nicotina

1.6.1. Generalidades

La nicotina al ser inhalada, llega rápidamente al cerebro (entre 7 y 10 segundos), donde se une a los receptores nicotínicos colinérgicos (nAChRs), éstos pueden ser homopentámeros (formados solo por subunidades $\alpha 7$ y en algunos casos subunidades $\alpha 9$ o $\alpha 10$) o heteropentámeros (formados por subunidades α y β), tras la unión de la droga al receptor

se observa elevación de dopamina en ciertas áreas cerebrales de la vía mesolímbica y de la vía mesocortical. La nicotina tiene una estructura similar a la acetilcolina; este neurotransmisor es un mensajero que está involucrado en los sistemas relacionados con aprendizaje, la memoria y algunas emociones. La acetilcolina es reconocida por su receptor porque su estructura molecular posee dos cargas eléctricas, una positiva y otra negativa; la distancia entre estas cargas es la misma en la molécula de nicotina (figura 3). Estas estructuras similares hacen que ambas moléculas se puedan unir a los receptores nicotínicos, pero a diferencia de la acetilcolina, la nicotina se mantiene unida al receptor mucho más tiempo y como consecuencia, tras una exposición crónica a la nicotina, una porción de los receptores nicotínicos resultan desensibilizados ⁵⁵. La nicotina altera la función de otros neurotransmisores como dopamina, norepinefrina, serotonina, glutamato, ácido gamma-amino butírico (GABA) y péptidos endógenos ⁵⁶.

Figura 3. Estructura química de la nicotina y de la acetilcolina. Tomada de Jiloha, 2010 ⁵⁵.

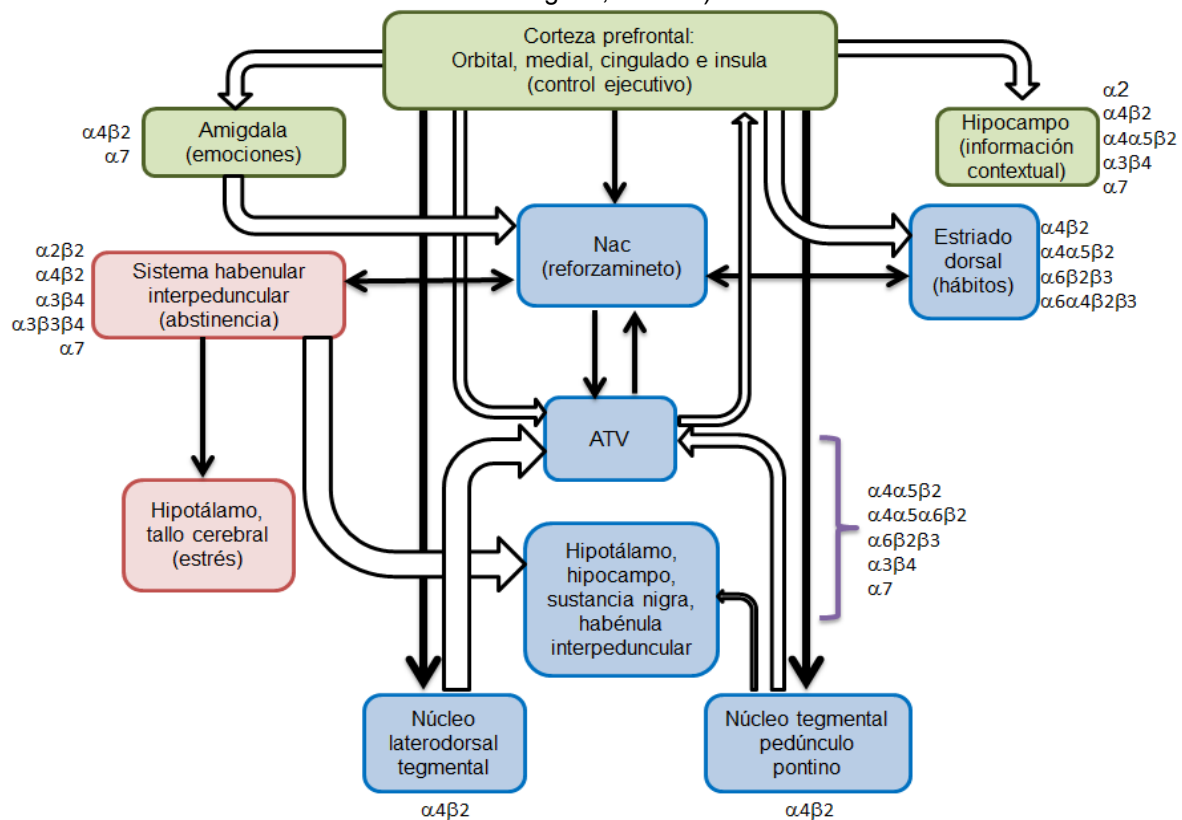


1.6.2. Receptores nicotínicos colinérgicos

Los receptores nicotínicos colinérgicos cerebrales, se encuentran en diversas regiones del sistema nervioso central, tales como el estriado, núcleo accumbens (Nac), el área tegmental

ventral (ATV), tálamo, hipotálamo, sustancia nigra, *locus coeruleus* (figura 4) ⁵⁷. Forman parte de una familia de 11 subunidades, codificadas por diversos genes ⁵⁸ (tabla 1) que se combinan para producir un canal iónico pentamérico ⁵⁹. El NC-IUPHAR (Subcomité de Receptores Nicotínicos de Acetilcolina de la Unión Internacional del Comité de Farmacología en Nomenclatura de Receptores y Clasificación de Drogas) identifica a las subunidades con una letra griega (α o β) seguida de un número arábigo ⁶⁰.

Figura 4. Distribución de los receptores nicotínicos colinérgicos en áreas cerebrales (Tomado de Changeux, 2010 ⁶¹).



La maquinaria celular responsable del ensamblado, maduración y tráfico de los complejos pentaméricos que se van a expresar en la superficie celular es el retículo endoplásmico, junto con las proteínas chaperonas, calnexina y calreticulina residentes en tal organelo, así como el complejo de Golgi. Las subunidades que no se encuentran ensambladas

correctamente o que no están unidas a calnexina son rápidamente degradadas vía proteasoma ⁶². En las balsas lipídicas de la membrana celular, los receptores nicotínicos colinérgicos son translocados para formar parte de la sinapsis neuronal ⁶³.

Su localización puede ser pre- o postsináptica, cuando son activados los receptores presinápticos pueden liberar los neurotransmisores tales como la acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutamato y GABA; cuando se estimulan los receptores postsinápticos se activa una serie de señales intracelulares implicadas en la excitabilidad celular, la expresión génica, la diferenciación celular y la supervivencia ⁶⁴.

Tabla 1. Subunidades α y β de los receptores nicotínicos colinérgicos en humano, localización cromosómica y productos codificantes de cada subunidad ⁶⁵.

Subunidad	Gen codificante	Cr	pb	Transcritos		
α	2	<i>CHRNA2</i>	8	20,121	8	
	3	<i>CHRNA3</i>	15	28,243	5	
	4	<i>CHRNA4</i>	20	35,088	4	
	5	<i>CHRNA5</i>	15	29,749	4	
	6	<i>CHRNA6</i>	8	43,772	3	
	7	<i>CHRNA7</i>	15	14,2031	6	
	9	<i>CHRNA9</i>	4	19,888	1	
	10	<i>CHRNA10</i>	11	5,797	3	
	β	2	<i>CHRNB2</i>	1	12,245	1
		3	<i>CHRNB3</i>	8	40,031	2
4		<i>CHRNB4</i>	15	96,167	4	

Cr, cromosoma; pb, pares de bases

Cada subunidad α tiene la siguiente estructura general: una proteína integral de membrana, con su extremo amino terminal extracelular, que contiene un dominio de 13 aminoácidos limitados por dos residuos de cisteína que forman un puente disulfuro llamado dominio cys, el cual caracteriza a este tipo de receptores; cuatro segmentos transmembrana (denominados M1-M4), la secuencia de aminoácidos del segmento M2 determina el tipo de ion y las propiedades conductivas del poro ⁶⁶; un dominio citoplasmático de tamaño variable entre el tercero y cuarto segmento transmembrana, el cual contiene una secuencia de aminoácidos única para cada subunidad y un pequeño extremo carboxilo terminal

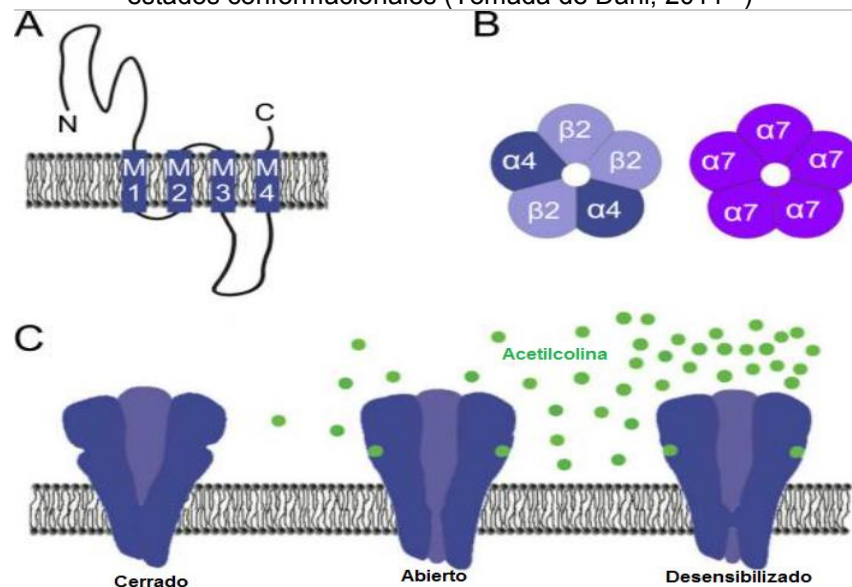
extracelular. El dominio amino terminal tiene una estructura de lámina beta que participa en el ensamble del complejo pentamérico, mientras que los segmentos transmembrana son alfa-hélices que se deben alinear para formar un poro iónico hidrofílico; las subunidades β difieren de las α en que las primeras carecen de dos cisteínas vecinas ^{60, 66}.

Mantener la densidad de los receptores nicotínicos en la sinapsis es importante para regular la comunicación eficaz entre neuronas, una variación significativa de estos receptores y por lo tanto del mecanismo de reciclaje, afecta la plasticidad cerebral ⁶⁷. Mediante técnicas de microscopía electrónica y electrofisiología actualmente se conoce la estructura y estados de transición del receptor en sus diversas conformaciones: el cerrado (en ausencia de ligando), el abierto (en presencia de ligando) y el desensibilizado (cuando hay una alta afinidad por el ligando) ⁶⁸. En la conformación cerrada, el lumen del pentámero se encuentra bloqueado por una barrera molecular formada por un anillo de residuos de leucina y un anillo de residuos de valina o isoleucina en la región media de M2. La unión del agonista desestabiliza las interacciones hidrofóbicas intersubunidades, seguido de la rotación (15°) de los cinco M2, esta rotación es suficiente para permitir el paso de cationes mono o divalentes ⁶⁹. Los azúcares altamente conservados en el extremo amino de las subunidades son importantes para acoplar la unión del agonista al pentámero, los glicanos pueden modular los estados abierto y cerrado del canal ⁷⁰. Para cada estado se han observado arreglos según la presencia o ausencia del agonista donde para dicha unión interviene el dominio cys y aminoácidos aromáticos formando el sitio de unión ^{71, 72}.

La activación de los receptores nicotínicos genera el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , esto ocasiona un cambio rápido en el potencial de membrana por el incremento intracelular en la concentración de Ca^{2+} , adicionalmente, los receptores nicotínicos pueden aumentar la concentración de Ca^{2+} por activación secundaria de canales de Ca^{2+} operados por voltaje ⁷³. En cuanto a la participación de los receptores nicotínicos en la adicción a la nicotina se

ha observado que las subunidades participan en diferentes niveles de esta enfermedad, tal es el caso de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ que se expresan en mayor cantidad en el cerebro y tiene gran afinidad por la nicotina ⁷⁴. El pentámero (figura 5) puede estar constituido por dos $\alpha 4$ y tres $\beta 2$, o bien por tres $\alpha 4$ y dos $\beta 2$; cada una de estas conformaciones proporciona al receptor diferente sensibilidad por el agonista, teniendo mayor sensibilidad para la primera conformación ($EC_{50}=1\mu M$) y menor para la segunda ($EC_{50}=100\mu M$) ⁷⁵.

Figura 5. Representación esquemática de los receptores nicotínicos colinérgicos. A) Arreglo de una sola subunidad donde se observan los segmentos transmembrana (M1-M4). B) Ejemplo de dos pentámeros, el primero de ellos heteromérico y el segundo homomérico. C) Esquema de los tres estados conformacionales (Tomada de Dani, 2011⁷⁶)



La nicotina actúa como una proteína chaperona capaz de estabilizar la estequiometría $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, existen modelos que explican que esta conformación favorece la unión de la nicotina a estos receptores ⁷⁷. Aproximadamente el 20% de los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ contienen la subunidad $\alpha 5$ ⁷⁸, esta última regula la cantidad de consumo de la nicotina ⁷⁹.

1.6.3. Neurocircuitos de la adicción

La adicción a la nicotina es una enfermedad que afecta la neuroplasticidad cerebral, el consumo del alcaloide facilita el proceso de memoria ⁸⁰; ésta se manifiesta cuando se

activan los circuitos cerebrales, entre ellos el sistema de recompensa, ocasionando la motivación para reanudar el consumo de la droga ⁸¹.

El incremento de dopamina en el Nac es el mecanismo responsable del efecto reforzador de la nicotina, debido a que las neuronas dopaminérgicas del ATV emiten sus proyecciones hacia esta área cerebral (vía mesolímbica dopaminérgica), posteriormente se descubrió que las neuronas de las vías mesoestriatal (proyecciones de sustancia nigra hacia estriado dorsal) y la mesocortical (proyecciones del ATV hacia corteza frontal) también poseen un papel importante en el mecanismo reforzador de la droga ⁸⁰.

En el Nac la nicotina primero activa a los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ ubicados sobre las neuronas GABAérgicas, el incremento de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas es seguida por la desensibilización de estos mismos receptores. La corteza prefrontal, amígdala e hipocampo proveen de señalización glutamatérgica al Nac mediante los receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), manteniendo esta activación y una prolongada potenciación de las vías aferentes dopaminérgicas regulando así estas proyecciones que van al ATV ⁶¹. En adición, las neuronas colinérgicas del tegmento pedúnculo pontino y del tegmento lateral dorsal proyectan sus axones al Nac activando de forma endógena a los receptores nicotínicos ubicados sobre las neuronas dopaminérgicas de esta área cerebral. El sistema dopaminérgico influye ampliamente en el procesamiento neuronal donde se regulan los mecanismos de reforzamiento (estriado ventral), aprendizaje y memoria (hipocampo), memoria emocional (amígdala), formación de hábitos (estriado dorsal), funciones ejecutivas y memoria (corteza prefrontal y orbito frontal) ⁸².

Existe evidencia de que la nicotina puede ocasionar efectos aversivos en los consumidores de grandes cantidades de la droga; en humano la estimulación del núcleo lateral de la habénula inhibe la concentración de dopamina en Nac y corteza prefrontal ⁸³, investigaciones posteriores han sugerido que el núcleo habenuar en lugar de proyectar sus

terminaciones directamente al ATV, ejerce sus efectos mediante la estimulación de las neuronas ubicadas en el núcleo tegmental rostro medial; éste a su vez envía proyecciones GABAérgicas al ATV inhibiendo las células dopaminérgicas ⁸⁴. La habénula media y el núcleo interpeduncular expresan gran cantidad de receptores con las subunidades $\beta 4$ y $\alpha 5$, estos son necesarios para la neuroadaptación que conduce a la presencia de los síntomas relacionados con el síndrome de abstinencia (irritabilidad, ansiedad, mal humor, dificultad de concentración, trastornos del sueño, incremento del apetito y ganancia de peso) ⁸⁵. Por otra parte, la vía amigdalina del sistema noradrenérgico, se relaciona con la adicción a la nicotina, el principal componente de este sistema es el “locus coeruleus”, un núcleo eminentemente noradrenérgico implicado en los estados de ansiedad. Se ha demostrado que, la administración de nicotina incrementa la expresión de tirosina hidroxilasa, una enzima involucrada en la síntesis de noradrenalina ⁸⁶, esto ocasiona aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario produciendo la hormona liberadora de corticotropina y la hormona adrenocorticotropa. Al dejar de fumar se descarga una gran cantidad de noradrenalina, lo cual se relaciona con situaciones de estrés y respuesta emocional (síndrome de abstinencia) ^{87, 6}.

Tras la exposición crónica a la nicotina algunos receptores nicotínicos se encuentran insensibles, pero otros no; como resultado de esto, el tono inhibitorio mediado por GABA disminuye mientras que la señalización excitadora mediada por glutamato persiste incrementando así la excitación en las neuronas dopaminérgicas y potenciando la respuesta a la nicotina ⁸⁸. La plasticidad sináptica es afectada debido a los cambios de las proteínas de estabilización de la sinapsis tales como PSD95 y Shank ⁸⁹, en las neuronas de la vía mesolímbica se ha detectado el aumento de los factores de transcripción CREB y Δ -Fos B que se sabe intervienen en la remodelación sináptica ⁸¹. El ATV en respuesta al glutamato libera factores neurotróficos tales como el factor básico de crecimiento de

fibroblastos, el factor neurotrópico derivado del cerebro, la neurotrofina 3 o el factor neutrófico de origen glial que mediaran cambios permanentes en el circuito neuronal del ATV ^{90, 91}.

1.6.4. Neurexina

Como consecuencia de los factores en el medio ambiente del organismo, en el cerebro se procesa la información y se transmiten señales mediante sinapsis neuronal, dicha comunicación debe llevarse a cabo de forma eficiente, dinámica y regulada; entre las moléculas de adhesión celular que se encargan de estabilizar y dar origen a la comunicación sináptica de tipo GABAérgica y glutamatérgica se encuentra la neurexina 1 ⁹², la cual es una proteína de membrana tipo 1, es decir, es una proteína transmembrana de un solo paso cuyo extremo amino terminal es extracelular. Ésta proteína se expresa en etapa embrionaria, se encuentra de forma larga (α -NRXN) y corta (β -NRXN), la primera se expresa en mayor proporción (69%) en las membranas presinápticas y en menor proporción (31%) en membranas postsinápticas, mientras que la β -NRXN1 en su mayoría (96%) se encuentra en las membranas presinápticas ⁹³, ambas contienen diferentes secuencias extracelulares en el extremo amino terminal, pero en la región transmembrana y el extremo carboxilo terminal son idénticas. La región extracelular de la forma alfa tiene seis dominios LNS (*laminin/neurexin/sex hormone-binding globulin-domain*) y tres dominios intercalados EGF (*Epidermal Growth Factor*); la forma corta solo posee un dominio LNS. La forma larga posee cinco sitios de empalme alternativo localizados adyacentes al dominio LNS, mientras que la forma corta solo posee dos ⁹⁴, lo que origina cientos de isoformas ⁹². Para que la neurexina lleve a cabo su función biológica debe unirse de forma específica a las neuroliginas, dicha interacción depende de Ca^{2+} , además se encuentra regulada por una variedad de mecanismos moleculares y biológicos que incluyen empalme alternativo,

glucosilación y oligomerización⁹⁵. También participa en la exocitosis de vesículas sinápticas y en la plasticidad cerebral⁹⁶.

1.7. Estudios de asociación genética en la adicción a la nicotina

El efecto reforzador de la nicotina es la razón principal de su consumo por los humanos, sin embargo, entre el 10 y 20% de los consumidores de cigarro nunca presentan adicción. Además del medio ambiente, se han descrito variables genéticas asociadas a mayor riesgo de consumo de cigarro, principalmente en población caucásica y afroamericana. En estudios en gemelos se observó que el componente genético para el consumo de cigarrillo contribuye hasta en un 35%⁹⁷.

Existen dos abordajes para la búsqueda de genes y variantes genéticas que participan en los rasgos y enfermedades comunes, como la adicción a la nicotina: a) los estudios de ligamiento, los cuales se basan en marcadores genéticos y fenotipos dentro de familias con individuos afectados y, b) los estudios de asociación genética basados en la identificación de diferencias significativas en la frecuencia de variantes genéticas entre grupos de estudio, generalmente un grupo de casos y uno de controles. El conocimiento de las variantes en estos grupos llevó a la identificación de factores genéticos asociados a riesgo o protección. Este tipo de estudios se enfrentan al hecho de que las enfermedades complejas, en relación a sus bases genéticas, presentan un escenario más problemático que las enfermedades monogénicas, puesto que incluye, la participación simultánea de varios genes y variantes genéticas (heterogeneidad genética y alélica respectivamente). Cabe recordar que, el hecho de que una variante genética en particular se encuentre asociada a la enfermedad, no es suficiente, ni necesaria para que ésta se presente⁹⁸.

Con los avances tecnológicos en materia de genómica, se han desarrollado estrategias para acelerar la identificación de genes asociados a enfermedades complejas; tales como los estudios de asociación de genoma completo "GWAS" (del inglés *Genome-Wide*

Association Studies). Su éxito depende de la correcta selección de grupos a analizar, tamaño de muestra apropiados, validación de resultados por otras metodologías y réplicas de la asociación en otras poblaciones. De muchos de los genes identificados recientemente, no se tenía la “sospecha” de su participación en la biología de la enfermedad en estudio, e incluso se han descrito asociaciones con regiones genómicas con función aún desconocida. Estos resultados se han logrado en buena medida debido a que los GWAS interrogan desde cientos de miles hasta millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a lo largo de todo el genoma, con estrategias que proveen una oportunidad única para la exploración del genoma libre de hipótesis ⁹⁹.

En 2010, Liu y su grupo de trabajo presentaron un meta-análisis de la asociación encontrada en 15q25, cromosoma donde se encuentra el conjunto de genes que codifican para receptores nicotínicos colinérgicos y la adicción a la nicotina ¹⁰⁰. En tanto Furberg, en el mismo año, publicó un meta-análisis de GWAS donde describe regiones génicas particularmente asociadas con la edad de inicio para fumar y otras regiones con asociación significativa para cesar la adicción ¹⁰¹. Thorgerirsson, en 2010, publica un meta-análisis de GWAS donde además de los nAChR relacionan los genes que codifican para enzimas que metabolizan la nicotina con la adicción al tabaco ¹⁰². Lou y colaboradores, en 2007, describen un estudio de mapeo fino del brazo corto del cromosoma 17 y su asociación con la vulnerabilidad a la dependencia a la nicotina ¹⁰³. Previamente, Li y colaboradores en 2009, analizaron la asociación de polimorfismos en dos receptores de GABA y la dependencia a la nicotina. En 2009 Chu y colaboradores, en población china, ¹⁰⁴ analizan polimorfismos presentes en el gen que codifica para el transportador de serotonina y los encuentran asociados al consumo regular de cigarrillo, sin embargo, en población polaca reportada por Sieminska, en 2008, tal asociación no se replica ⁵⁸. Mobascher, en 2010, publica un trabajo

donde el gen que codifica para el receptor muscarínico 2 de acetilcolina, presenta polimorfismos en la región 5' que se asocian con la adicción a la nicotina ¹⁰⁵.

1.7.1 Polimorfismos asociados con adicción a nicotina identificados por estrategia de gen funcional

Estudios genéticos del receptor D4 de dopamina (*DRD4*) se han centrado en un polimorfismo de tipo VNTR (Repetidos en Tándem de Número Variable). La importancia biológica de dicha variabilidad genética se traduce en alteraciones en la longitud del receptor. El VNTR de 48 pares de bases (pb) reside en el exón 3, el cual codifica para el tercer dominio intracelular de la proteína. Los alelos cortos, denominados S (constituidos por 4 repetidos) tienen menos eficiencia en cuanto a la señalización, en comparación con los alelos largos, denominados L (constituidos por 7 repeticiones). Shields y colaboradores, en 1998, en un estudio de fumadores y no fumadores afroamericanos, encontraron asociación significativa relacionada a un alto riesgo a fumar en aquellos individuos portadores del alelo largo (L); sin embargo, en el mismo estudio usando una población caucásica no se replica dicha asociación ¹⁰⁶.

En 2008, Perkins y colaboradores, en un estudio con población caucásica con adicción a la nicotina, asociaron la presencia del alelo largo (9 repetidos) en el gen *SLC6A3* (transportador de dopamina) con el incremento en el número de cigarrillos fumados y el estado de ansiedad ¹⁰⁷. En otro estudio realizado por Sieminska en 2009, en población polaca, encontraron que, aquellos individuos no portadores del alelo largo de *SLC6A3* presentan mayor riesgo a fumar, antes de los 20 años de edad, en comparación con aquellos individuos portadores del alelo largo, del mismo modo, estudiaron la asociación entre la cantidad de cigarrillos fumados al día, encontraron que los sujetos portadores del alelo largo pueden pasar más tiempo sin consumir un cigarro en comparación de aquellos con el alelo corto ¹⁰⁸.

El sistema serotoninérgico está implicado en el consumo de nicotina, el transportador de serotonina mantiene la concentración de serotonina en la sinapsis nerviosa, el gen que codifica dicha proteína es un candidato de estudio para la adicción, ya que está relacionado con ansiedad y depresión. Existen estudios que asocian la región promotora del gen con la eficacia transcripcional; en tal región existen dos alelos comunes, una inserción de 44 pb (alelo L) o una delección (alelo S). El alelo S se ha asociado a la disminución de la actividad transcripcional en comparación con el alelo L. Chu y colaboradores en 2009, encontraron en varones fumadores de origen chino los genotipos L/L y S/L con mayor frecuencia en comparación con no fumadores; además, tales genotipos resultaron asociados al nivel de consumo de cigarros y la dependencia a la nicotina ¹⁰⁴. En contraste, Sieminska en 2008, estudiando una población de Polonia, no encontró asociación entre el alelo L y el estado de fumar, las diferencias comienzan desde la distribución de las frecuencias alélicas cuando compara la población polaca con la japonesa usada por Ishikawa, y hace énfasis en la diferente distribución genética según el origen racial y étnico. Es importante remarcar que el comportamiento del consumo de cigarro y la capacidad para dejarlo están influenciados por otros genes relacionados a la adicción, así como a rasgos de la personalidad, estado de ansiedad, etc. ⁵⁸

1.7.2 SNP en genes relacionados con adicción a nicotina identificados por GWAS

Se han caracterizado regiones génicas, con SNP asociados al consumo de tabaco, relacionadas con componentes de la vía dopaminérgica o bien con el metabolismo de los neurotransmisores. En los últimos años, empleando GWAS, se han identificado genes que, previamente no habían sido descritos como involucrados en el proceso de adicción, tal es el caso de la neurexina 1 (*NRXN1*) y neurexina 3 (*NRXN3*). La familia de los genes de neurexina codifica para un grupo de proteínas de superficie celular, se expresan principalmente en neuronas, son necesarias para la liberación normal de

neurotransmisores. La neurexina es un factor importante en la génesis de la sinapsis. El gen *VPS13A* (proteína vacuolar de selección 13, variante de transcripción A, homóloga de *VPS13A* en *S. cerevisiae*) es otro candidato de susceptibilidad a la adicción al tabaco, las variaciones de dicho gen causan neurodegeneración progresiva⁸. Liu y su grupo de trabajo, en 2010, publicaron un meta-análisis de GWAS, identificaron marcadores genéticos situados en una región cercana al gen *BDNF* (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) asociados al consumo de tabaco. Dicho gen codifica para proteínas de la familia de las neurotrofinas que regulan la plasticidad y la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y colinérgicas; resulta plausible que variaciones presentes en *BDNF* puedan alterar los efectos gratificantes de la nicotina a través de la modulación de los circuitos de recompensa de dopamina. Por otro lado, se observó asociación entre el rs3025343 del gen *DBH* (dopamina beta-hidroxilasa) con la cesación del consumo de tabaco; la proteína que codifica tal gen participa en el metabolismo de la dopamina¹⁰¹.

1.7.3 Abordaje genético de receptores nicotínicos colinérgicos con la adicción a nicotina

Mediante GWAS, se ha reportado asociación entre SNP de receptores nicotínicos y la dependencia a la nicotina, o bien a otros fenotipos relacionados al consumo de cigarro. Se encontraron asociaciones significativas en los grupos de genes codificados en el cromosoma 15 (tabla 2), formado por *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*. Stevens y colaboradores en 2009, estudiaron a 1,395 fumadores ligeros (aquellos que fuman menos de 5 cigarros por día) y 1,452 fumadores pesados (fuman 30 o más cigarros por día), encontraron 13 SNP en el conjunto de genes del cromosoma 15, que se asocian de manera significativa al grupo de fumadores pesados⁷. Saccone y colaboradores en 2009, publicaron un estudio asociado con la dependencia a la nicotina en población caucásica y afroamericana; tomaron como grupo control a individuos con una puntuación de 0 a 1 en el cuestionario de Fagerström y para el grupo de dependientes a la nicotina a individuos con

puntuación ≥ 4 , para población caucásica incluyeron 1,063 casos y 999 controles mientras que para afroamericanos 461 casos y 249 controles, encontraron 5 SNP con asociación significativa en el gen *CHRNA5*, 11 SNP en el gen *CHRNA3* y uno asociado en *CHRNA4*¹⁰⁹. Li y su grupo, en 2010, reportaron 2 SNP dentro de la misma región genética con asociación a la cantidad de cigarrillos consumidos en población coreana¹¹⁰. En 2008 Berrettini y colaboradores, al estudiar población europea, sugieren haplotipos formados por los genes *CHRNA5/CHRNA3* que predisponen a la dependencia a la nicotina¹¹¹. Una variante, replicada en diversas poblaciones con asociación a la dependencia a la nicotina es el rs16969968 en el gen *CHRNA5*. La presencia del polimorfismo ocasiona un cambio en la secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (alelo G) por asparagina (alelo A) en la posición 398 de la proteína, lo que ocasiona un cambio en la carga del segundo dominio intracelular de la subunidad $\alpha 5$ ¹¹². Bierut en 2008, revela que la presencia del alelo menor (A) del rs16969968 altera la función del receptor nicotínico colinérgico, debido a que en ensayos celulares resulta evidente el cambio en la concentración de calcio intracelular cuando está presente dicho polimorfismo. Este grupo de trabajo concluye que la disminución en la función del receptor nicotínico colinérgico se asocia con un riesgo significativo de dependencia a la nicotina, ya que en aquellos sujetos con el alelo A en el *CHRNA5* requieren de mayor cantidad de nicotina para activar la vía dopaminérgica¹¹³. Lips en 2009 reporta que, en población europea con la variante homocigota AA para dicho SNP, se asocia al grupo de fumadores que consumen 20 o más cigarrillos por día ($p < 0.001$, OR= 1.81, IC95%= 1.30-2.13)¹¹⁴; Hong en 2010 demuestra que, dicho cambio afecta de forma significativa la señalización cerebral de sujetos consumidores de tabaco, observando cambios en las regiones del estriado ventral, la amígdala e hipocampo¹¹⁵. Janes en 2011 sugiere que, los fumadores que presentan la variante A del rs16969968 son más propensos a tener fuertes recuerdos asociados al consumo de cigarro, plantea que el alelo A tiene un

papel importante en el proceso de memoria ¹¹⁶. En 2010, el consorcio de tabaco y genética de la Universidad de Carolina de Estados Unidos, realizó un meta-análisis de 16 estudios originales de dependencia a la nicotina con algunos fenotipos asociados al consumo de tabaco; entre sus hallazgos resaltan los polimorfismos del *CHRNA5* asociados a los cigarrillos consumidos por día, entre ellos, el rs16969968 ($p=5.57E-72$), otro hallazgo importante fue el alelo A del rs1051730, corresponde a un incremento de 1 en la cantidad de cigarrillos fumados ($p=2.75E-73$) ¹⁰¹. En 2011 Grucza, incorpora a la dependencia a la nicotina la interacción con múltiples genes; estudio 811 individuos caucásicos no dependientes y 797 fumadores dependientes (4 puntos o más en el cuestionario de Fagerström), en cuanto a los nAChR encuentran asociación con 3 SNP de *CHRNA5* de los cuales el rs16969968 y rs578776 ya se habían reportado anteriormente en al menos dos poblaciones diferentes ¹¹⁷. En 2009, Saccone en población europea, observó haplotipos dentro del grupo de genes *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* y *CHRNA3-CHRNA6* asociados al riesgo a dependencia a la nicotina ¹¹⁸. En 2010, el mismo grupo, publica datos de SNP asociados a la dependencia a la nicotina en los genes *CHRNA7*, *CHRNA4*, *CHRNA1* y *CHRNA3*, además de replicar el hallazgo realizado en otras poblaciones que indican que la probabilidad de dejar de fumar es más alta en población afroamericana, al ser comparada con caucásica y que los afroamericanos tienen mayor riesgo de presentar dependencia a la nicotina con menos cigarrillos consumidos por día, comparado con el consumo de cigarrillo en caucásicos ¹¹⁹.

1.7.4 Variantes genéticas en neurexinas asociadas con adicción a la nicotina

Posterior al hallazgo mediante GWAS del gen de *NRXN1* en la adicción a la nicotina, éste ha sido poco explorado, en 2008 Nussbaum en población afroamericana y caucásica encontraron tres SNP en región intrónica. Los autores proponen que, por su localización probablemente estarían afectando en el proceso de el corte y empalme alternativo, lo cual

genera isoformas que influyen en la formación de circuitos neuronales ¹²⁰. Otro miembro de la familia de las neurexinas, asociada con la dependencia a la nicotina, es el gen de *NRXN3*, se ha asociado con la dependencia al alcohol. Kelai en 2008, reporta que esta familia de genes que codifican para neurexinas, se encuentra involucradas en el proceso de adicción a las drogas ya que sus resultados, obtenidos en modelo murino, revelan que la exposición a drogas induce un cambio en la expresión de dichos genes ¹²¹.

Tabla 2. Estudios de asociación genética realizados en cromosoma 15

Gen	SNP	Región	Pob	p	OR (95% IC)	Ref
<i>CHRNA5</i>	rs684513	Intrón	CeU	1.13E-07	0.70 (0.61-0.80)	7
	rs667282	Intrón		1.68E-04	0.75 (0.64-0.87)	109
	rs17486278	Intrón	CeU	7.00E-08	1.37 (1.22-1.54)	7
			AA	4.43E-02	1.28(1.01-1.63)	109
			CeU	5.74E-07	1.40 (1.23-1.59)	
	rs569207	Intrón	CeU	1.40E-08	0.69 (0.61-0.79)	7
	rs637137	Intrón	CeU	1.30E-08	0.69 (0.61-0.79)	7
			CeU	1.03E-04	0.74 (0.64-0.86)	109
				0.00184	0.74 (0.62-0.90)	117
	rs951266	Intrón	AA	4.51E-02	1.45 (1.01-2.06)	109
			CeU	9.83E-07	1.39 (1.22-1.57)	
			Kor	0.008	1.48(1.11-1.98)	110
	rs16969968	No-sin, N398D	CeU	6.30E-08	1.37 (1.22-1.54)	7
				4.04E-02	1.9(1.4-2.6)	112
				0.00044	1.34 (1.14-1.58)	117
				1.298E-04	1.31 (1.14-1.50)	118
				AA	1.47E-02	2.04(1.15-3.62)
	rs578776	3'UTR	CeU	4.14E-07	1.40(1.23-1.59)	7
				1.37E-06	0.75 (0.66-0.87)	7
				0.00038	0.73 (0.61-0.87)	117
rs1051730	Sin, Y215Y	CeU	9.30E-08	1.37 (1.22-1.53)	7	
			2.007E-04	1.3 (1.13-1.49)	118	
<i>CHRNA3</i>	rs3743078	Intrón	AA	6.76E-02	1.38 (0.98-1.95)	109
			CeU	5.00E-09	0.69 (0.60-0.78)	7
	rs1317286	Intrón	AA	6.76E-02	1.38(0.98-1.95)	109
			CeU	4.44E-06	1.36(1.19-1.54)	
	rs938682	Intrón	CeU	2.87E-04	0.76(0.65-0.87)	
	rs11637630	Intrón	CeU	5.00E-09	0.69 (0.60-0.78)	7
	rs7177514	Intrón	CeU	2.10E-04	0.75(0.65-0.87)	109
			CeU	3.10E-04	0.76(0.65-0.88)	
	rs6495308	Intrón	CeU	2.64E-04	0.76(0.65-0.87)	
	rs8042059	Intrón	CeU	3.23E-04	0.76(0.65-0.88)	
	rs8042374	Intrón	CeU	5.21E-04	0.77(0.66-0.89)	
	rs4887069	Intrón	CeU	2.40E-04	0.76(0.65-0.87)	
	rs17487223	Intrón	CeU	8.07E-07	1.33 (1.18-1.48)	7
	rs12440014	Intrón	AA	2.07E-02	1.59(1.07-2.36)	7
			CeU	3.45E-07	0.72(0.64-0.82)	
<i>CHRNA7</i>	rs11636605	Intrón	CeU	1.18E-06	0.72 (0.63-0.82)	112
				6.562E-03	1.27 (1.07-1.50)	118
	rs11072768	Intrón	Kor	0.028	1.17(1.02-1.34)	110
	rs12441998	Intrón	CeU	3.807E-03	1.28 (1.08-1.52)	118
				3.18E-06	0.73 (0.64-0.83)	7
rs1316971	Intrón	CeU	3.910E-03	1.29(1.08-1.53)	118	
<i>CHRNA7</i>	rs1913456	Intrón		3.29E-02	1.28(1.02-1.60)	
	rs6494212	Intrón	AA	2.70E-03	1.44(1.14-1.83)	119
	rs904951	Intrón		3.14E-02	1.30(1.02-1.65)	

Pob: población, CeU: caucásica, AA: afroamericana, Kor: coreana.

2.0 Hipótesis

Existe diferencia en la frecuencia de los polimorfismos tipo SNP en los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4*, asociados a consumo de cigarro o bien, asociados a mayor grado de adicción a la nicotina en fumadores mestizos mexicanos.

3.0 Objetivo General

Identificar polimorfismos genéticos tipo SNP asociados a consumo de cigarro o bien, a mayor grado de adicción al cigarro, en los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4*.

3.1 Objetivos Específicos

- 3.1.1 Buscar SNP con asociación a adicción a la nicotina en estudios previos.
- 3.1.2 Seleccionar SNP etiqueta en los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4*.
- 3.1.3 Determinar las frecuencias alélicas de los SNP seleccionados en una población de referencia no fumadora.
- 3.1.4 Evaluar SNP en los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4* asociados a consumo de cigarro.
- 3.1.5 Analizar los SNP en los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4* y determinar su asociación con mayor grado de adicción al cigarro.
- 3.1.6 Validar los polimorfismos genéticos asociados a consumo de cigarro y a mayor grado de adicción a la nicotina.
- 3.1.7 Predecir la función biológica de los SNP asociados y validados en el proceso de adicción al cigarro.

4.0 Metodología

4.1 Población de estudio

Se realizó un estudio transversal analítico en dos etapas, para ello fueron incluidos 1949 individuos, los cuales fueron invitados a participar en el estudio en el departamento de investigación en tabaquismo y EPOC del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, fueron realizados exámenes clínicos y psicológicos, por médicos neumólogos especialistas y psicólogos. Los participantes firmaron el consentimiento informado, este fue aprobado previamente por el Comité de Ciencia y Bioética del INER (B20-08). A cada participante se le asignó una clave alfa numérica con la finalidad de cubrir los criterios de confidencialidad de datos. Se realizó un cuestionario de antecedentes familiares, así como el consumo de cigarro para los individuos fumadores.

4.1.1 Definición de los grupos de estudio

- No fumadores (NF): Individuos clínicamente sanos, sin adicción a drogas.
- Fumadores ligeros (FL): Fumador activo de al menos 10 años, con consumo de 1 a 10 cigarros por día (cpd); solo con adicción al cigarro.
- Fumadores pesados (FP): Fumador activo de al menos 10 años, con consumo de 20 o más cpd; solo con adicción al cigarro.

4.1.2 Criterios de inclusión y eliminación

a) Criterios de inclusión:

Mestizos mexicanos por abolengo (padres y abuelos nacidos en México).

Mayores de 30 años de edad.

Sin enfermedades psiquiátricas.

b) Criterios de eliminación:

Diagnóstico de enfermedades psiquiátricas.

Adicción a drogas diferentes al cigarro.

Que no acepten la invitación como voluntarios para participar en el proyecto.

Falta de la carta de consentimiento informado con sus respectivos datos y firmas.

Cuestionario de datos incompleto.

Muestra biológica insuficiente o de calidad analítica inapropiada.

4.2. Obtención de material genético

En un tubo con EDTA como anticoagulante, se obtuvieron 8 mL de sangre periférica mediante punción venosa, posteriormente se realizó la extracción de DNA genómico utilizando el estuche comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA). El DNA fue cuantificado por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 260 nm de longitud de onda. La contaminación con proteínas se determinó a 280 nm y se consideró una muestra libre de contaminantes cuando la relación 260/280 estaba entre 1.7-2.0.

4.3 Diseño del estudio

Se realizó un estudio en dos etapas, la etapa 1 fue en el mapeo fino (mediante la búsqueda de SNP etiquetada) de los genes *NRXN1*, *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4* en el 31% de los individuos de cada grupo de estudio, la genotipificación se realizó mediante un microarreglo en la modalidad “diseño a la medida”; la etapa 2 fue la validación del hallazgo genético obtenido en la etapa anterior, para ello se realizó la genotipificación del 69% de la población de cada grupo de estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en su modalidad discriminación alélica.

4.3.1 Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue calculado empleando el software *CaTS Power Calculator for Two Stage Association Studies*¹²², el cual fue diseñado para estudios de asociación genética realizados en dos etapas, fueron considerados los siguientes parámetros empleando un modelo codominante: prevalencia de la enfermedad 22%³, frecuencia del alelo menor

(MAF)=7%, OR=2, porcentaje de muestras destinadas para la primer etapa 31%, mientras que para la segunda 69%, nivel de significancia, $p=0.001$; con las condiciones antes descritas se obtuvo un poder estadístico de 100% en 606 FL, 606 FP y 606 NF.

4.3.2 Etapa 1: Diseño del microarreglo

El microarreglo empleado pertenece a la plataforma de Illumina (Illumina, Inc., San Diego CA, USA), en la modalidad diseño a “la medida”, para ello fue necesario seleccionar y enviar la lista de SNP de interés a la compañía para que, aplicaran sus criterios de control de calidad. Para nuestro estudio fue seleccionada la plataforma que permite explorar 384 SNP en una sola reacción por microarreglo.

4.3.2.1. Selección de SNP asociados previamente con adicción a la nicotina

Fue consultada la base del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), usando las palabras clave: *dependence to nicotine, association, GWAS, smokers*; del resultado obtenido fueron seleccionados los artículos publicados entre 2008 y 2013 con resultados de SNP asociados con adicción a la nicotina, edad de inicio de consumo de cigarro o bien cpd; las estrategias empleadas en estos trabajos fueron la de gen candidato y de genoma completo. Cada artículo fue analizado según la población empleada (origen étnico y número de sujetos analizados), fueron tomados aquellos estudios con valores de p significativos, fue revisado el valor de OR o β según el análisis empleado en cada trabajo, así como los intervalos de confianza (95%). Se generó un registro con los SNP que resultaron con asociación significativa, estuvo formada por 35 polimorfismos (rs951266, rs17408276, rs16969968, rs615470, rs621849, rs905739, rs17486278, rs680244, rs667282, rs637137, rs569207, rs8043123, rs4887077, rs2869550, rs11638372, rs8034191, rs8192475, rs8023462, rs1948, rs3743078, rs12914385, rs8040868, rs578776, rs6495307, rs1051730, rs7177514, rs12443170, rs6495308, rs1317286, rs11637890, rs17487223, rs3813567, rs11072768, rs3841324, rs684513) en la región del cromosoma 15 (*CHRNA3, CHRNA5*,

CHRNA4) y 5 SNP en el gen *NRXN1* (rs10490162, rs2193225, rs6721498, rs10490227, rs10208208).

4.3.2.2. Selección de SNP etiqueta dentro de regiones genómicas de interés

Se realizó una búsqueda de SNP etiqueta en los genes *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA4*, *NRXN1*, con el software HaploView ¹²³. Como referencia se tomó la población de mexicanos de Los Angeles del HapMap ¹²⁴. Los criterios establecidos fueron: MAF $\geq 7\%$; valor de $r^2 > 0.8$; la distancia mínima y máxima entre cada SNP etiqueta, recomendada por el fabricante del microarreglo, debía ser de 60 pb y 200 pb respectivamente y que cumplieran con el equilibrio de HW con un valor de $p \geq 0.0001$ (suplemento D).

Una vez obtenidos los SNP etiqueta (tabla 3) en cada población se realizó un registro con los datos de cada gen estudiado, esto con la finalidad de seleccionar los SNP que se incluirían el microarreglo.

Tabla 3. SNP etiqueta en los genes analizados y cobertura en cada región

Gen	Cr	Variabilidad genética capturada (%)	SNP en gen	SNP etiqueta
<i>NRXN1</i>	2	99	430	202
<i>CHRNA5/A3/B4</i>	15	97	44	10

Cr, Cromosoma

4.3.2.3 Selección de marcadores informativos de ancestría (AIMs)

Con la finalidad de evaluar el origen poblacional de los individuos incluidos en el estudio y evitar que las asociaciones encontradas presenten estratificación poblacional, fueron incluidos 37 AIMs, estos cumplieron los siguientes criterios: ΔF (diferencia de la frecuencia del SNP entre dos poblaciones) > 0.5 , r^2 entre AIMs < 0.4 y distancia máxima entre estos > 500 kb. Fueron empleadas como poblaciones de referencia el grupo de caucásicos (CEU) del proyecto internacional del HapMap ¹²⁴ y amerindios (ZAP: grupo de indígenas del estado

de Oaxaca) del proyecto de diversidad genómica del mestizo mexicano (suplemento E) ¹²⁵,

126.

4.3.2.4 Genotipificación por GoldenGate

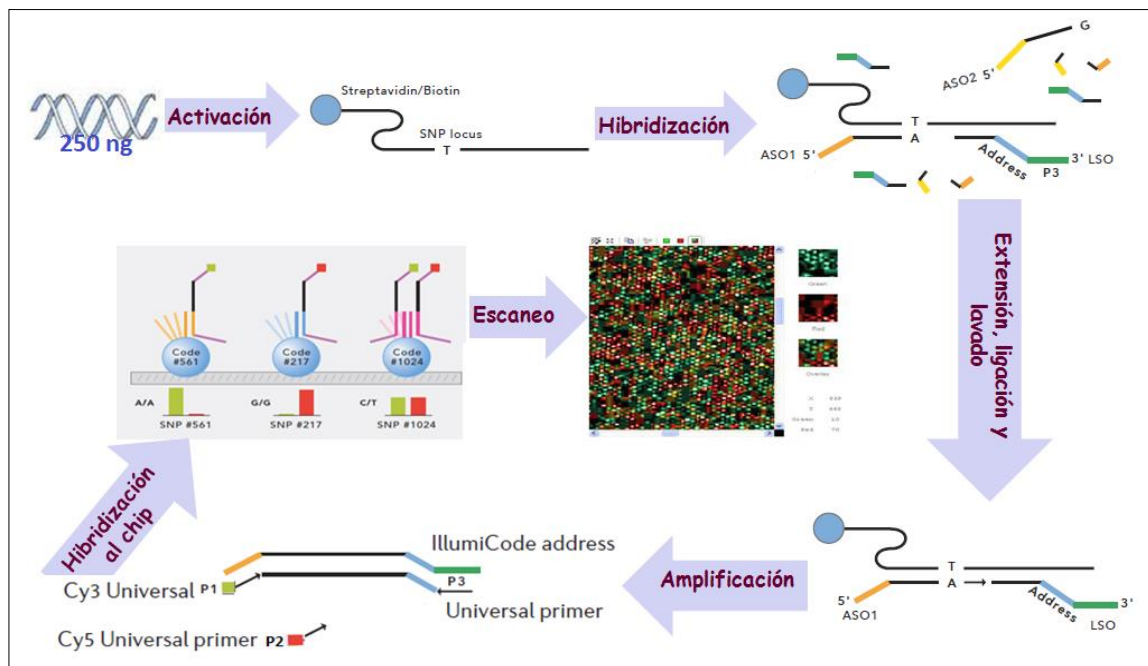
La genotipificación se llevó a cabo empleando la tecnología GoldenGate, diseño a la medida, se fundamenta en la activación del DNA con estreptavidina, una vez activado es capaz de unirse a las partículas paramagnéticas y posteriormente es alineado con los oligonucleótidos alelo específico 1 (ASO1), y alelo específico 2 (ASO2), que van a identificar al SNP y al oligonucleótido de direccionalidad, una vez alineado, es lavado para eliminar el exceso de reactivos, se realiza una ligación para que posteriormente se lleve a cabo la amplificación del DNA por medio de una reacción de PCR; en la mezcla de ésta se encuentran 3 oligonucleótidos universales, Cy3 que se incorpora a ASO1 y Cy5 que se incorpora a ASO2 y un anticuerpo biotinilado complementario al locus específico de direccionalidad, el cual posteriormente servirá para inmovilizar el producto de PCR sobre el microarreglo de genotipificación.

El escáner utilizado para estos microarreglos es el modelo denominado *Bead Array Reader*, el cual emplea láser para excitar la fluorescencia de la extensión de una sola base. Los fluoróforos presentan una imagen de alta resolución, en cada sección de los microarreglos. Los datos de estas imágenes fueron analizados, para determinar cada genotipo de los SNP probados, usando el software *Beadstudio* con el módulo de genotipificación (*Genotyping Module*); el protocolo a detalle se muestra en el suplemento F y en la figura 6 se esquematizan los pasos a seguir para la genotipificación por GoldenGate. La generación de los documentos (archivos: .ped y .map) se realizaron empleando el programa *GenomeStudio* 2011 v1.0 de la misma plataforma de Illumina, fueron eliminados aquellos individuos que tuvieron un éxito en la tasa de genotipificación (*call rate*) <95%.

El archivo *ped* se encuentra formado por 7 columnas que se describen a continuación:

1. Identificador por familia (0 si es un estudio de casos y controles).
2. Identificador por individuo.
3. Identificador del padre (0 si es un estudio de casos y controles).
4. Identificador de la madre (0 si es un estudio de casos y controles).
5. Identificador de género (1=masculino 2= femenino).
6. Estado de afección (1=no afectado, 2= afectado, 0= desconocido).
7. Genotipos del marcador, cada uno representado por dos columnas, una para cada alelo separado por un espacio.

Figura 6. Esquema de la técnica de genotipificación masiva modalidad GoldenGate de Illumina



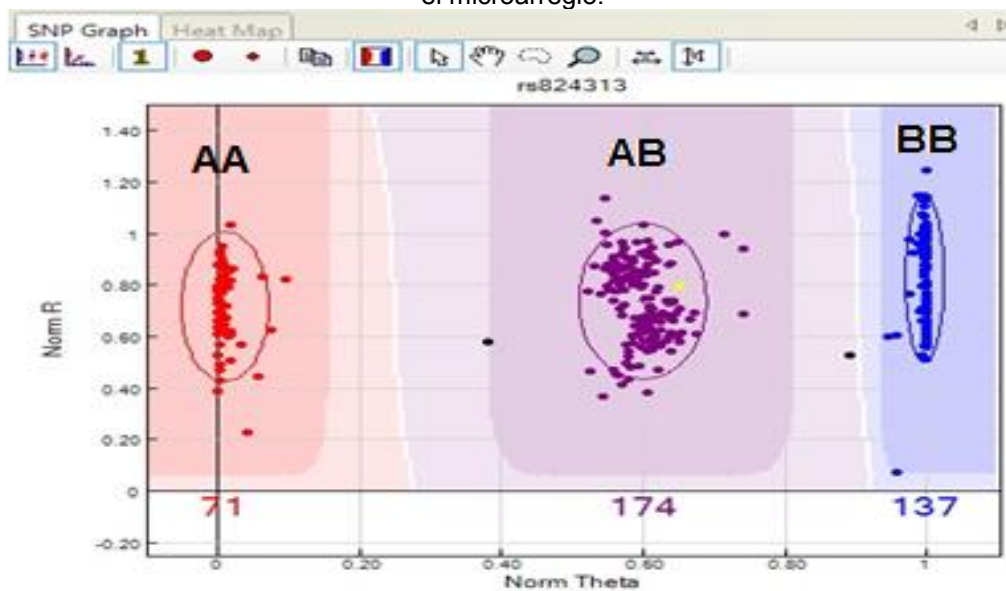
El archivo *map* contiene información sobre los marcadores genéticos incluidos en el análisis:

1. Número de cromosoma.
2. Número de rs del SNP.

3. Distancia genética (Morgans).
4. Posición (pares de bases).

La obtención de genotipos se realizó usando el software *GenomeStudio* el cual muestra una gráfica (figura 7) para cada uno de los SNP genotificados con tres zonas definidas según *GenCall Score*, este último es un parámetro empleado por el software que toma en cuenta el ángulo, la dispersión y la intensidad de la señal emitida por el fluoruro, para así asignar el genotipo correspondiente en cada una de las tres zonas.

Figura 7. Distribución de los genotipos de los sujetos en estudio, ejemplo para un SNP incluido en el microarreglo.



4.3.3 Etapa 2: Selección de polimorfismos genéticos a validar

Fueron validados en 414 sujetos de cada grupo, aquellos SNP que en la etapa 1 resultaron con asociación alélica ($p < 0.01$) posterior corrección de Bonferroni, a consumo de cigarro o bien al grado de adicción a la nicotina, con un valor de $OR \geq 3.0$ y donde fuera posible realizar el análisis por haplotipos, es decir, dos o más SNP en un mismo gen.

4.3.3.1 Genotipificación por PCR en tiempo real

Fueron empleadas sondas prediseñadas Taqman en un termociclador de PCR en tiempo real (*7300 Real Time PCR Systems, Applied Biosystems, CA, USA*). Las condiciones del ensayo fueron: Pre-lectura 50°C, 1 minuto; tiempo real: 50°C, 2 minutos, 1 ciclo; 95°C, 10 minutos, 1 ciclo; 95°C, 15 segundos, 60°C 1 minuto, 40 ciclos; post-lectura 50°C, 1 minuto. La asignación de genotipos fue realizada tomando la discriminación alélica y fue confirmada por medio de tiempo real; adicionalmente se incluyeron tres controles sin templado (controles de contaminación) por cada placa de genotipificación, y el 1% de las muestras incluidas en el estudio se genotipificaron por duplicado, como control de asignación de alelos, el fundamento de la técnica se describe en el suplemento G. La interpretación de datos fue realizada a través de *Sequence Detection Software* (SDS v. 1.4, *Applied Biosystems, CA, USA*). Los fluoróforos empleados en cada SNP fueron VIC para el alelo A y FAM para el alelo B.

4.4 Análisis estadístico

Para describir las variables demográficas y clínicas de la población de estudio, fue empleado el programa SPSS v.15.0, se calcularon las medianas y la desviación estándar de cada variable, excepto para sexo, donde se realizó una prueba ANOVA. La evaluación de la ancestría poblacional se realizó mediante análisis de componentes principales (PCA) usando el programa *Eigensoft* v4.2¹²⁷, para ello fueron incluidas las poblaciones de referencia (CEU y ZAP). Se obtuvo el índice de fijación (*Fst*) para estimar la diferencia genética entre las poblaciones incluidas en el estudio. Se realizó equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) en el grupo de referencia (NF) para excluir aquellos SNP que no cumplieran con dicho parámetro, fueron excluidos los SNP con una frecuencia del alelo menor (MAF) $< 7\%$. Los SNP que cumplieron con los criterios antes mencionados fueron analizados mediante el uso del programa *Plink* 1.07¹²⁸, para ello fue empleado un modelo

de regresión logística (con 1 grado de libertad) incluyendo como covariables edad, sexo y los tres primeros componentes principales obtenidos mediante PCA (este criterio solo fue aplicado en la etapa 1, debido a que en el microarreglo se incluyeron AIMs). Para identificar marcadores genéticos asociados a consumo de cigarro se realizaron las comparaciones FP vs. NF y FL vs. NF, para evaluar los polimorfismos asociados a mayor grado de adicción a la nicotina fue realizada la comparación FP vs. FL. Los valores de significancia obtenidos en cada comparación fueron corregidos mediante Bonferroni. La estructura de desequilibrio de ligamiento y la determinación de haplotipos asociados se realizó mediante el uso del programa *Haploview 4.2* empleando los criterios establecidos por Gabriel y colaboradores. Para el análisis de asociación por genotipos, fue empleado el programa *Epidat* versión 3.1¹²⁹ empleando un modelo codominante, con tablas de contingencia de 2X3 e intervalos de confianza de 95%. Al finalizar la etapa 2, fue realizado un análisis in silico, para aquellos SNP con función biológica no reportada en la literatura previa, fueron empleados los programas *Pupasuit 3.1*¹³⁰, para evaluar la posible presencia de sitios que afecten el corte y empalme alternativo y *miRDB software*¹³¹, el cual predice la posible generación de micro RNAs así como los posibles genes blanco; para nuestro estudio solo fueron considerados los genes que estuvieran codificando para proteínas involucradas en las vías dopaminérgica, GABAérgica, serotoninérgica, glutamatérgica y colinérgica, esto por ser las vías que participan en el establecimiento de adicción a nicotina. Fueron considerados aquellos microRNA predichos con homología >80% a microRNAs reportados en la base de datos miRbase¹³².

5.0 Resultados

5.1. Participantes en el estudio

Se recolectaron un total de 2000 muestras, procedentes del INER. Se excluyeron 182 por no cumplir con los criterios de inclusión antes mencionados. La descripción de los datos demográficos y clínicos se describe en la tabla 4, en ella se observa que la media de edad y el sexo entre los grupos de estudio presentan diferencias estadísticamente significativas, por ello, para ambas etapas fueron incluidas como covariables en el modelo de regresión logística. En cuanto a la edad de inicio de consumo, se observa que los fumadores pesados comienzan a edad más temprana comparada con el grupo FL.

Tabla 4. Variables demográficas de los individuos incluidos en el estudio

Variable	Etapa 1			Etapa 2			p
	FP	FL	NF	FP	FL	NF	
n	187	328	192	414	414	414	
Edad (años)	53±6	53±10	62±14	57±12	55±14	62±15	<0.001*
Sexo (H) %	49	41	17	65	46	14	<0.001**
Consumo de cigarro (años)	34±8	28±11		33±12	30±14		<0.001*
Cpd	24±7	6±3		26±11	8±3		<0.001*
Edad de inicio de consumo (años)	17±5	20±7		17±5	18±6		<0.001*

Se muestran medianas (desviación estándar) de cada variable, excepto para género donde se muestra porcentajes de hombres (H). *ANOVA; ** χ^2 cuadrada.

5.2. Obtención de genotipos, etapa 1

Los 384 SNP incluidos en el microarreglo presentaron un éxito en la tasa de genotipificación $\geq 95\%$, los 37 AIMs fueron extraídos en un archivo diferente para posterior análisis de ancestría poblacional, el resto de los SNP de asociación (347) se emplearon para generar los archivos: .ped y .map previamente descritos.

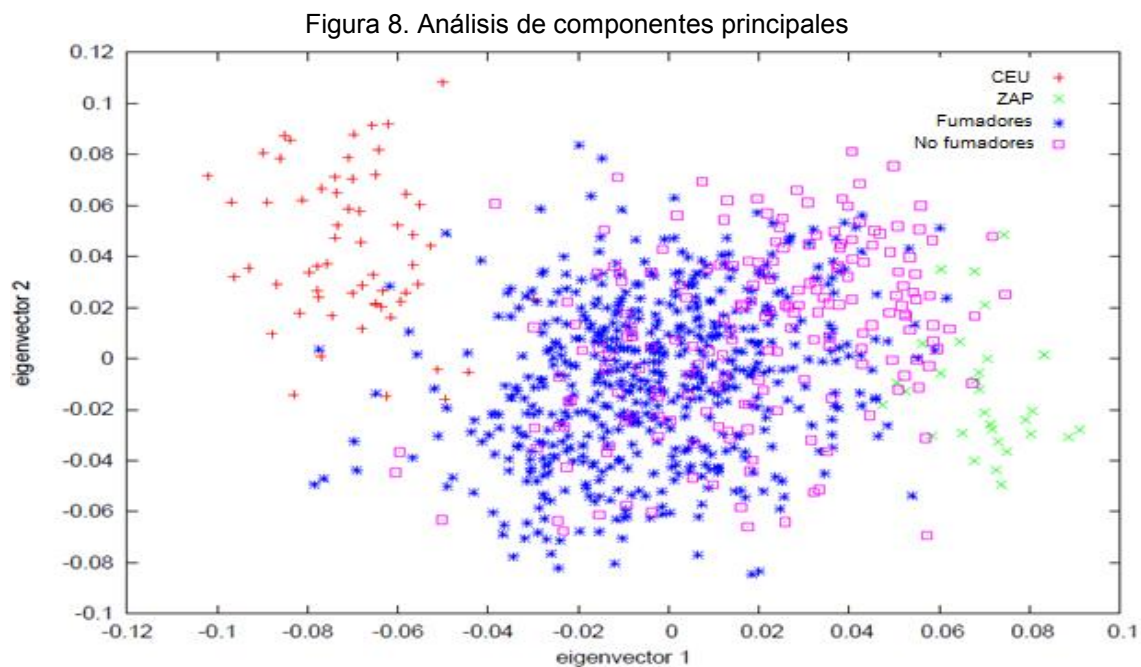
5.3 Análisis de ancestría poblacional, etapa 1

Los 37 AIMs fueron analizados con *Eigensoft*, en la tabla 5 se muestra el *Fst* obtenido para las poblaciones de estudio y para las poblaciones de referencia. Se observa que entre

fumadores y no fumadores hay un valor de $F_{st}=0.03$, por tal motivo, los tres primeros componentes principales fueron usados como covariables en el modelo de regresión logística empleado para el análisis de asociación genética. Mediante el PCA se obtuvo la figura 8 donde se observa que el grupo de fumadores y no fumadores se distribuyen entre las poblaciones de referencia CEU y amerindia.

Tabla 5 Índice de fijación (F_{st}) obtenido entre los grupos de estudio

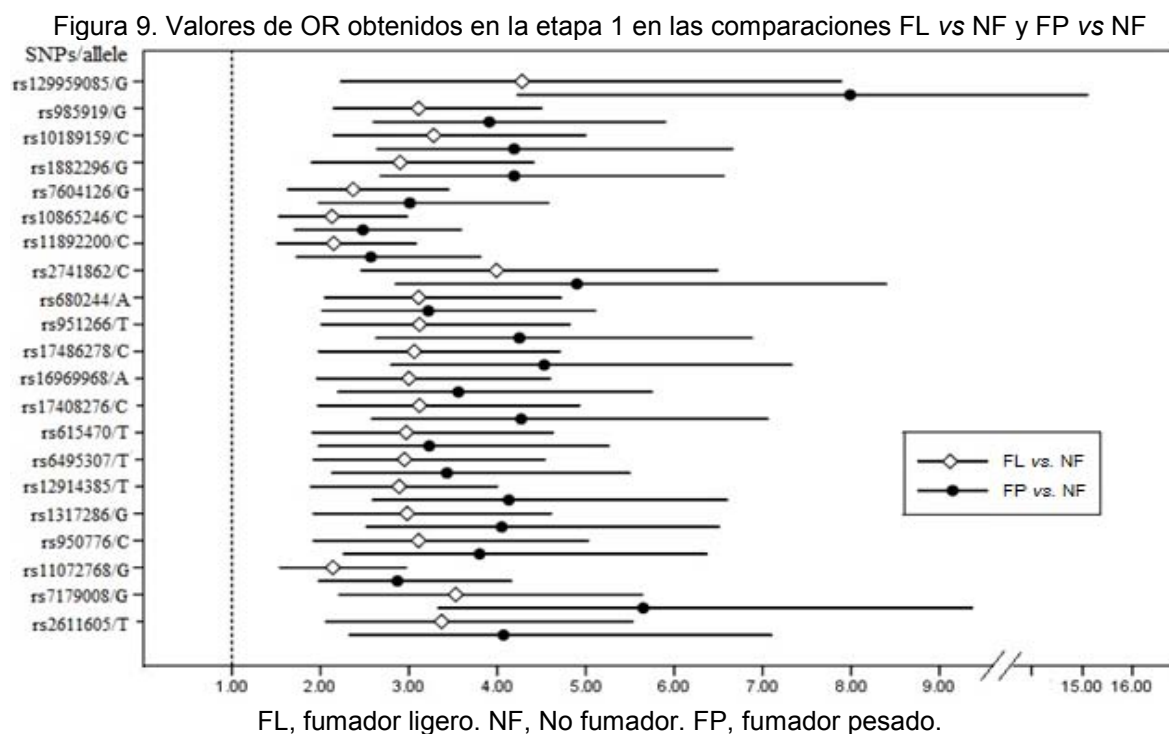
F_{st}	ZAP	Fumadores	NF
CEU	0.405	0.119	0.203
ZAP	0	0.181	0.133
Fumadores		0	0.030



5.4 Análisis por alelos, genotipos y haplotipos, etapa 1

El archivo *.ped* generado estuvo compuesto por 347 SNP, fueron excluidos 26 polimorfismos, por no cumplir con los criterios de equilibrio de Hardy-Weinberg en la población NF y por presentar $MAF < 7\%$. Con los 321 SNP que cumplieron los criterios, se realizó el análisis de asociación alélica empleando edad, género y los tres primeros

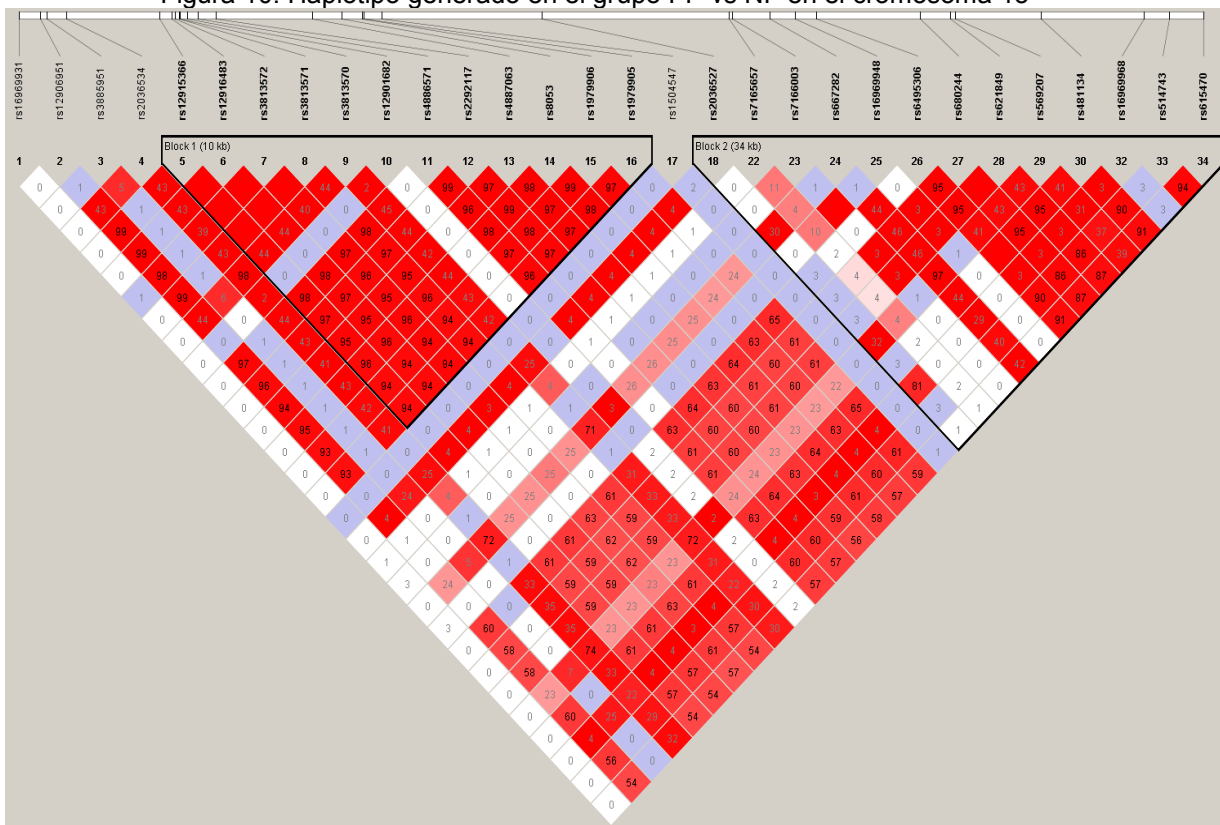
componentes principales del PCA como covariables. En la tabla 6 se muestran los resultados de asociación alélica obtenidos de las comparaciones FL vs. NF y FP vs. NF. Los genes *NRXN1* y *CHRNA5* son los que presentan más SNP asociados, en la comparación FL vs. NF, los OR oscilan entre 2.13 y 4.28, en la comparación FP vs. NF el OR, por lo general, es mayor que en la comparación FL vs. NF. Los valores de OR para cada alelo en cada una de las comparaciones se muestran en la figura 9.



Para los 18 SNP reportados en la tabla 6, se realizó análisis por genotipos, con modelo codominante, en la tabla 7 se presentan los polimorfismos asociados, en ella se muestran tres SNP en el gen *NRXN1*, dos en *CHRNA3* y dos más en *CHRNA5*. Adicionalmente fueron comparadas las frecuencias genotípicas y alélicas entre los dos grupos de fumadores, en la tabla 8 se muestran los SNP con asociación estadísticamente significativa para la comparación FP vs. FL, los valores de OR son menores que los reportados en la tabla 6,

además, solo el rs12995085 de *NRXN1* mantuvo la asociación posterior a la corrección de Bonferroni ($p=0.0048$). Al usar el software *HaploView* en los 4 genes de interés se obtuvieron regiones con alto desequilibrio de ligamiento ($r^2>0.8$), sobre todo en el gen *CHRNA5* (figura 10), sin embargo, no se encontraron haplotipos asociados a consumo de cigarro o bien a adicción a la nicotina.

Figura 10. Haplotipo generado en el grupo FP vs NF en el cromosoma 15



NF, No fumador. FP, fumador pesado.

Tabla 6. Etapa 1: Alelos asociados en la comparación FL vs. NF y FP vs. NF

Gen	SNP	AA	FP vs. NF			FL vs. NF		
			p ^c	OR	95%IC	p ^c	OR	95%IC
<i>NRXN1</i>	rs12995085	G	1.45E-10	7.99	4.23-15.10	3.01E-06	4.28	2.23-7.89
	rs985919	C	2.15E-08	3.91	2.60-5.90	5.84E-07	3.11	2.15-4.50
	rs10189159	C	3.80E-07	4.19	2.64-6.66	1.07E-05	3.28	2.15-5.00
	rs1882296	C	1.05E-07	4.19	2.68-6.56	2.22E-04	3.00	1.90-4.41
	rs7604126	C	7.36E-05	3.01	1.98-4.58	1.83E-03	2.37	1.63-3.45
	rs10865246	C	4.54E-04	2.48	1.71-3.59	2.50E-03	2.13	1.53-2.98
	rs11892200	C	8.13E-04	2.57	1.73-3.81	7.85E-03	2.15	1.51-3.08
<i>CHRNA5</i>	rs680244	A	2.32E-04	3.22	2.02-5.11	2.91E-05	3.11	2.05-4.72
	rs951266	T	1.18E-06	4.25	2.63-6.88	1.05E-04	3.12	2.01-4.82
	rs17486278	C	2.16E-07	4.53	2.80-7.33	1.21E-04	3.06	1.98-4.71
	rs16969968	A	6.73E-05	3.56	2.20-5.75	1.34E-04	3.00	1.96-4.60
	rs17408276	C	4.96E-06	4.27	2.58-7.06	3.30E-04	3.12	1.97-4.93
	rs615470	T	8.23E-04	3.23	1.98-5.26	4.53E-04	3.00	1.91-4.63
<i>CHRNA3</i>	rs6495307	T	1.06E-04	3.43	2.13-5.50	2.64E-04	2.95	1.92-4.54
	rs12914385	T	8.58E-07	4.13	2.59-6.60	2.97E-04	2.89	1.89-4.43
	rs1317286	G	2.24E-06	4.05	2.52-6.51	3.00E-04	3.00	1.92-4.61
<i>CHRN4</i>	rs950776	C	1.29E-04	3.80	2.26-6.37	1.16E-03	3.11	1.92-5.03
	rs11072768	G	6.95E-06	2.87	1.98-4.16	1.68E-03	2.14	1.54-2.97

p^c obtenida mediante χ^2 y posterior corrección de Bonferroni. AA=Alelo asociado. FL, fumador ligero. NF, No fumador. FP, fumador pesado.

Tabla 7. Etapa 1: Asociación genotípica en los genes *NRXN1*, *CHRNA3* y *CHRNA5* en las comparaciones FP vs. NF y FL vs. NF

SNP	Frecuencia genotípica (%)			FP vs. NF			FL vs NF			
	Genotipo	FP (n=187)	FL (n=328)	NF (n=192)	p	OR	95% CI	p	OR	IC 95%
<i>NRXN1</i>	rs12995085									
	AA	0.561 (56.1)	0.737 (73.7)	0.916 (91.6)		1.00			1.00	
	AG	0.385 (38.5)	0.253 (25.3)	0.083 (8.33)	<0.001	7.54	4.16-16.65	<0.001	3.77	2.13-6.66
	GG	0.053 (5.34)	0.009 (0.91)	0						
	rs985919									
	AA	0.262 (26.2)	0.359 (35.9)	0.656 (65.6)		1.00			1.00	
	AC	0.588 (58.8)	0.560 (56.0)	0.307 (30.7)	<0.001	4.79	3.03-7.57	<0.001	3.33	2.26-4.89
	AA	0.149 (14.9)	0.079 (7.9)	0.036 (3.6)		10.28	4.21-25.08	<0.001	3.96	1.65-9.48
	rs10865246									
AA	0.288 (28.8)	0.350 (35.0)	0.557 (55.7)		1.00			1.00		
AC	0.534 (53.4)	0.356 (35.6)	0.385 (38.5)	<0.001	2.67	1.71-4.17	<0.001	2.22	1.52-3.24	
CC	0.176 (17.6)	0.109 (10.9)	0.057 (5.7)		5.94	2.78-12.66	<0.001	3.04	1.47-6.28	
<i>CHRNA3</i>	rs6495307									
	CC	0.513 (51.3)	0.588 (58.8)	0.822 (82.2)		1.00			1.00	
	CT	0.422 (42.2)	0.356 (35.6)	0.166 (16.6)	<0.001	4.06	2.50-6.58	<0.001	2.99	1.92-4.66
	TT	0.053 (5.3)	0.036 (3.6)	0.010 (1.0)		8.22	1.76-38.35	<0.001	4.91	1.08-22.27
	rs12914385									
	CC	0.454 (45.4)	0.548 (54.8)	0.822 (82.2)		1.00			1.00	
CT	0.459 (45.9)	0.396 (39.6)	0.161 (16.1)	<0.001	5.15	3.16-8.40	<0.001	3.68	2.35-5.75	
TT	0.080 (8.0)	0.039 (3.9)	0.015 (1.5)		9.29	2.61-33.00	<0.001	3.80	1.06-13.59	
<i>CHRNA5</i>	rs680244									
	GG	0.524 (52.4)	0.564 (56.4)	0.822 (82.2)		1.00			1.00	
	AG	0.411 (41.1)	0.381 (38.1)	0.161 (16.1)	<0.001	4.00	2.46-6.51	<0.001	3.44	2.20-5.38
	AA	0.058 (5.8)	0.054 (5.4)	0.015 (1.5)		5.91	1.60-21.71	<0.001	5.12	1.48-17.71
	rs16969968									
	GG	0.545 (54.5)	0.579 (57.9)	0.843 (84.3)		1.00			1.00	
GA	0.379 (37.9)	0.359 (35.9)	0.140 (14.0)	<0.001	4.17	2.51-6.93	<0.001	3.72	2.33-5.94	
AA	0.069 (6.9)	0.054 (5.5)	0.015 (1.5)		6.88	1.91-24.74	<0.001	5.11	1.48-17.67	

FL, fumador ligero. NF, No fumador. FP, fumador pesado.

Tabla 8. Etapa 1. Análisis de asociación genotípica y alélica entre el grupo FP vs. FL

SNP	FP (n=187)		FL (n=328)		p	OR	IC 95%
	n	FG/FA (%)	n	FG/FA (%)			
rs12914385 (<i>CHRNA3</i>)							
CC	85	0.454 (45.4)	180	0.548 (54.8)	0.0108	1.00	
CT	86	0.459 (45.9)	130	0.396 (39.6)		1.40	0.96-2.03
TT	15	0.080 (8.0)	13	0.039 (3.9)		2.44	1.11-5.36
C	256	0.688 (68.8)	490	0.759 (75.9)	0.0178	0.70	0.52-0.93
T	116	0.312 (31.2)	156	0.241 (24.1)		1.42	1.07-1.89
rs12995085 (<i>NRXN1</i>)							
AA	105	0.561 (56.1)	242	0.737 (73.7)	<0.0001	1.00	
AG	72	0.385 (38.5)	83	0.253 (25.3)		1.99	1.35-2.95
GG	10	0.053 (5.34)	3	0.009 (0.91)		7.68	2.07-28.48
A	282	0.754 (75.4)	567	0.864 (86.4)		0.48	0.35-0.66
G	92	0.246 (24.6)	89	0.136 (13.6)		2.07	1.50-2.87
rs985919 (<i>NRXN1</i>)							
TT	49	0.262 (26.2)	118	0.359 (35.9)	0.0030	1.00	
TG	110	0.588 (58.8)	184	0.560 (56.0)		1.43	0.95-2.16
GG	28	0.149 (14.9)	26	0.079 (7.9)		2.59	1.38-4.86
T	208	0.556 (55.6)	420	0.640 (64.0)	0.0095	0.70	0.54-0.91
G	166	0.444 (44.4)	236	0.360 (36.0)		1.42	1.09-1.84

FL, fumador ligero. FP, fumador pesado. FG, frecuencia génica. FA, frecuencia alélica

5.5 Validación de la etapa 1

5.5.1 Selección de SNP para validar en etapa 2

Fueron seleccionados los polimorfismos que en la etapa 1 por asociación alélica en las comparaciones FP vs. NF y FL vs. NF, resultaron asociados posterior corrección de Bonferroni y con valores de OR ≥ 3.0 , de tal forma que para *NRXN1* se validaron 5 SNP (rs12995085, rs985919, rs10189159, rs1882296 y rs7604126), seis para *CHRNA5* (rs680244, rs951266, rs17486278, rs16969968, rs17408276 y rs615470) y tres para *CHRNA3* (rs6495607, rs12914385 y rs1317286).

5.5.2 Obtención de genotipos

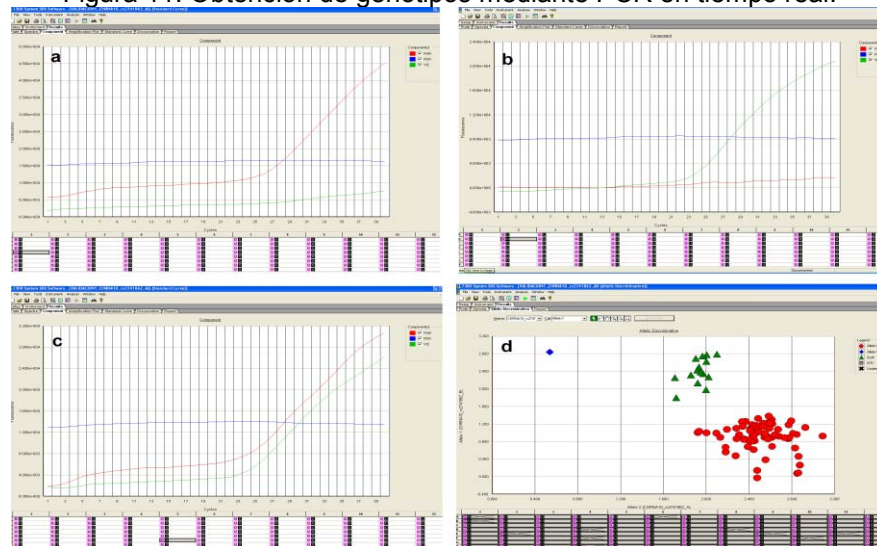
La obtención de genotipos de cada participante se obtuvo por discriminación alélica, mediante el software *7500 System SDS (Applied Biosystems)*. En la figura 11a y 11b se observa una curva para un individuo homocigoto para el alelo 1 (FAM) o para el alelo 2 (VIC) según corresponda, mientras que en la figura 11c se tiene la imagen de un individuo heterocigoto. La figura 11d representa el mapa de discriminación alélica.

5.5.3 Resultados de asociación alélica, genotípica y de haplotipos, etapa 2

Para los 14 SNP mencionados en la sección 5.5.1, se aplicó el modelo de regresión logística, para esta etapa solo se emplearon como covariables edad y sexo, en la tabla 9 se muestran los resultados de asociación alélica para aquellos SNP con asociación posterior corrección de Bonferroni, en las comparaciones FL vs. NF y FP vs. NF. Cabe destacar que los polimorfismos en el gen *CHRNA3* perdieron la asociación en esta etapa.

Para la comparación entre FP vs. FL el alelo C del rs10865246 en el gen *NRXN1* resultó asociado ($p=2.79E-02$) posterior corrección de Bonferroni, con un valor de OR=1.38 (IC 95%, 1.12-1.70). El análisis de genotipos se realizó nuevamente bajo un modelo codominante, en la tabla 10 se muestran los datos obtenidos para las comparaciones FP vs. NF, FL vs. NF; en la primer comparación (FP vs. NF), los SNP de *NRXN1* tienen un OR de 2.01 y 2.21 para cada uno de los genotipos heterocigotos en los rs985919 (AC) y rs1882296 (TC), cuando para estos mismos polimorfismos se observan los valores de OR con el genotipo homocigoto con el alelo de riesgo estos valores casi se duplican (OR=5.78 y 4.07 respectivamente).

Figura 11. Obtención de genotipos mediante PCR en tiempo real.



a. homocigoto para el alelo marcado con el fluoróforo FAM. b. homocigoto marcado con el fluoróforo VIC. c. heterocigoto para el alelo en cuestión. d. cada punto representa un individuo genotificado para este SNP, se encuentran agrupados según el genotipo correspondiente.

Tabla 9. Etapa 2: Asociación alélica en las comparaciones FL vs. NF y FP vs. NF

Gen	SNP	AA	FP vs. NF			FL vs. NF		
			p ^c	OR	95% (IC)	p ^c	OR	95% (IC)
<i>NRXN1</i>	rs985919	C	1.57E-06	2.00	1.54-2.60	6.95E-02	1.73	1.36-2.20
	rs1882296	C	2.24E-05	2.07	1.53-2.79	2.42E-02	1.53	1.16-2.01
<i>CHRNA5</i>	rs16969968	A	3.08E-03	1.76	1.29-2.39	2.71E-03	1.74	1.29-2.34
	rs17408276	C	9.20E-07	2.67	1.86-3.82	8.26E-03	1.78	1.27-2.48

p^c obtenida mediante χ^2 y posterior corrección de Bonferroni. FL, fumador ligero. NF, No fumador. FP, fumador pesado.

Para el rs16969968 de *CHRNA5* el genotipo heterocigoto (GA) o bien el homocigoto con el alelo de riesgo (AA) presentan valores de OR similares (2.05 y 2.51 respectivamente). Por último, para el rs17408276 solo hay asociación cuando se tiene el genotipo heterocigoto (TC) con un valor de OR=2.07, cuando está el genotipo homocigoto con el alelo de riesgo (CC) esta asociación se pierde, posiblemente sea porque estos genotipos en cada una de las poblaciones analizadas se encuentran en baja frecuencia en nuestra población de estudio (por debajo del 5%). Para la comparación FL vs. NF los polimorfismos tienen una tendencia similar a la observada en la comparación FP vs. NF, sin embargo, la asociación para el rs16969968 genotipo AA se pierde y nuevamente puede ser porque en los grupos FL y NF estos presentan una frecuencia genotípica menor del 5%. Por último, para la comparación FP vs. FL solo se obtuvieron valores de p significativos para el genotipo homocigoto (CC) del rs10865246 en *NRXN1* (FP: FG=16% vs. FL: FG=8.3%), asociados con un valor de OR=2.35 (IC 95%, 1.48-3.72). El análisis por haplotipos, nuevamente, mostró sobre todo para el gen *CHRNA5*, que existe alto desequilibrio de ligamiento, pero no hubo haplotipos asociados en las tres comparaciones.

5.6 Análisis in silico

Los polimorfismos asociados en este estudio, ubicados en el gen *CHRNA5*, han sido replicados en otras poblaciones como la caucásica y afroamericana, sin embargo, los ubicados en *NRXN1* no han sido reportados con asociación en adicción a la nicotina.

Tabla 10. Etapa 2: Genotipos asociados en los genes *NRXN1* y *CHRNA5* a consumo de cigarro.

SNP/ Genotipo	Frecuencia genotípica %			FP vs. NF			FL vs. NF			
	FP (n=415)	FL (n=415)	NF (n=415)	p	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	
<i>NRXN1</i>	rs985919									
	AA	41.7	48.1	63.4		1		1		
	AC	43.3	40.9	32.7	<0.0000	2.01	1.50-2.69	<0.0000	1.65	1.23-2.20
	CC	15.0	11.0	3.9		5.78	3.27-10.20		3.66	2.03-6.56
	rs1882296									
	TT	57.9	67.1	76.6		1		1		
TC	35.7	26.5	21.3	<0.0000	2.21	1.62-3.01	0.0003	1.41	1.02-1.94	
CC	6.4	6.4	2.1		4.07	1.88-8.82		3.51	1.62-7.59	
<i>CHRNA5</i>	rs16969968									
	GG	65.2	68.6	79.8		1		1		
	GA	29.6	29.0	17.6	<0.0000	2.05	1.48-2.84	0.0013	1.92	1.38-2.66
	AA	5.2	2.4	2.6		2.51	1.19-5.27		NS	
	rs17408276									
	TT	71.9	75.7	84.5		1		1		
TC	25.7	22.4	14.6	<0.0000	2.07	1.46-2.92	0.0014	1.70	1.20-2.43	
CC	2.4	1.9	0.9		NSD			NSD		

FL, fumador ligero. NF, No fumador. FP, fumador pesado.

Entre los estudios de genoma completo realizados en población caucásica el gen *NRXN1* presenta variantes genéticas asociadas con adicción, es un gen grande (1,114,031 pb), con miles de SNP (540,503), puede generar 32 transcritos debido a que presenta varios sitios de corte y empalme alternativo y recientemente se ha comprobado que, dentro de las regiones intrónicas del gen, existen secuencias que generan miRNA. Por ello mediante el uso del programa Pupasuit 3.1, fue evaluada la presencia de los SNP rs985919, rs1882296 y rs10865246 en sitios que pudieran estar involucrados en los sitios de corte y empalme alternativo, sin embargo, no se obtuvieron datos positivos para esto. Posteriormente mediante el uso del programa miRDB fue evaluada una secuencia de 10pb río arriba y 10 pb río abajo con respecto a cada uno de los SNP de interés, esto con la finalidad de probar si los polimorfismos asociados en *NRXN1* se encontraban formando parte de un miRNA. Se tomaron aquellos miRNA predichos por el programa con una homología >80% a un miRNA de humano reportado hasta la fecha en miRbase, de igual forma para los posibles genes blanco, solo fueron considerados aquellos con un puntaje asignado por el programa >80% y que estuvieran codificando para proteínas que participen en vías cerebrales que participen en el proceso de adicción a la nicotina. Considerando estos criterios, solo la secuencia probada que contenía el rs1882296 cumple con ello, en la tabla 11 se muestra cada una de las secuencias cuya homología a miRNAs reportados en base de datos existe en humano, así como los genes blanco.

Tabla 11. Análisis in silico de posibles miRNAs generados con el rs1882296 de *NRXN1*

	Alelo común	Alelo de riesgo
Secuencia de miRNA	AGT[T]TGGAATAGAGAAAG	ATAGT[C]TGGAATAGAGA
Posibles genes blanco	<i>GABRB2</i>	
	<i>GRID2</i>	
	<i>GABRG1</i>	<i>GABRB2</i>
	<i>GRIA2</i>	<i>GRID2</i>
	<i>GABRA4</i>	
miRNA reportado en humano	Hsa-miR-6740-5p	Hsa-miR-6866-5p
Homología (%)	83.4	88.3

6.0 Discusión

El principal fenotipo asociado que predice el grado de adicción a la nicotina es la cantidad de cigarrillos consumidos por día (cpd) ¹³³. Los fumadores pesados (≥ 20 cpd) presentan mayor grado de adicción, mayor dificultad para dejar de fumar, más síntomas del síndrome de abstinencia, tolerancia y mayor puntuación en el cuestionario de Fagerström comparados con los fumadores ligeros (< 10 cpd) ¹³⁴. ¹³⁵. Estudios en gemelos indican que existe una alta heredabilidad en la adicción a la nicotina, la cual varía dependiendo la población estudiada ¹³⁶. Estos reportes han sido realizados principalmente en población caucásica, afroamericana y asiática, sin embargo los datos para población mexicana, que por sus características exhiben diferentes grados de mestizaje, son escasos; en el presente trabajo evaluamos la ancestría poblacional empleando 37 AIMs, encontramos diferencia en el *Fst* entre fumadores y no fumadores ($Fst=0.030$), a pesar de que no es un *Fst* que indique gran diferencia entre las poblaciones estudiadas en el presente trabajo, como sucede entre las poblaciones CEU y ZAP, $Fst=0.405$, fue considerada la ancestría poblacional como una covariable para corregir en el análisis de asociación alélica en la etapa 1.

En trabajos previos empleando la estrategia de genoma completo se han caracterizado regiones génicas con SNP asociados al consumo de tabaco que están relacionadas con componentes de la vía dopaminérgica; tal es el caso de la familia de los genes de neurexina, que codifican un grupo de proteínas de superficie celular que se expresan principalmente en neuronas. La neurexina 1 (codificada por el gen *NRXN1*) es un factor importante en la génesis de la sinapsis, en 2007 Bierut y colaboradores encontraron tres SNP (rs10490162, rs12467557 y rs12623467) en el intrón 1 del gen, en población afroamericana y caucásica ⁸; sin embargo, solo uno de los tres SNP (rs10490162) mantuvo la asociación significativa en población Europea-Americana ¹²⁰, en población mestiza-mexicana encontramos y validamos dos SNP (rs985919 y rs1882296) asociados al consumo de tabaco (FL & FP vs. NF). En adición, el alelo C del rs10865246 fue asociado en la comparación FP vs. FL, que indica alto grado de adicción a la nicotina; la frecuencia de este alelo es mayor en el

grupo FP comparada con la frecuencia en el grupo FL (44.4% vs. 37.9%). En el análisis por genotipos, esta asociación es mayor cuando se encuentra el genotipo homocigoto (CC, OR=2.35). Los miembros de esta familia de genes se encuentran involucrados en el proceso de adicción a las drogas, según resultados obtenidos en modelo murino revela que, la exposición a drogas induce un cambio en la expresión de dichos genes ¹²¹.

Otro grupo de genes ampliamente asociados con la adicción a la nicotina son los que codifican para los nAChR cerebrales. El receptor de mayor afinidad está formado por las subunidades $\alpha 4\beta 2$, que puede presentar la estequiometría $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ y $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, de los cuales el primero es más sensible a la nicotina y se encuentra en mayor proporción en individuos que se exponen por largos periodos a la nicotina ^{137, 138}. Se han reportado asociaciones entre SNP de nAChR con adicción a la nicotina y fenotipos relacionados al consumo de cigarro, particularmente en el grupo de genes codificados en el cromosoma 15, (*CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*). En 2008 Berrettini y colaboradores al estudiar población europea reportaron haplotipos formados por los genes *CHRNA5/CHRNA3* que predisponen a la adicción a la nicotina ¹¹¹. Posteriormente, Stevens y colaboradores en 2009, realizaron un estudio, incluyó fumadores ligeros (<5 cpd) y fumadores pesados (>30 cpd), en este reporte encontraron 13 SNP que se asocian de manera significativa al grupo FP ⁷. Saccone y colaboradores en el mismo año describieron 5 SNP con asociación significativa en el gen *CHRNA5*, 11 SNP en *CHRNA3* y uno asociado en *CHRNA4*, tomaron como grupo control a individuos con una puntuación de 0 a 1 en el cuestionario de Fagerström y para el grupo de adicción a la nicotina a individuos con puntuación de ≥ 4 ¹⁰⁹; en población coreana se reportaron 2 SNP dentro de la misma región genética con asociación a la cantidad de cigarrillos consumidos ¹¹⁰.

La validación en fumadores mestizos mexicanos mostró que, los polimorfismos rs16969968 y rs17408276 del gen *CHRNA5* se encuentran asociados a consumo de cigarro. La presencia del alelo A en el rs16969967 ocasiona un cambio en la secuencia de aminoácidos, de ácido aspártico (alelo G) por asparagina (alelo A) en la posición 398 de la proteína, lo que ocasiona un cambio en la carga

del segundo dominio intracelular de la subunidad $\alpha 5$ ¹¹². La presencia del alelo menor (A) del rs16969968 altera la función del receptor nicotínico colinérgico debido a que en ensayos celulares produce cambio en la concentración de calcio intracelular cuando está presente dicho polimorfismo, concluyeron que la disminución en la función del receptor nicotínico colinérgico se asocia con un riesgo significativo de dependencia a la nicotina, ya que en aquellos sujetos con el alelo A en *CHRNA5* requieren de mayor cantidad de nicotina para activar la vía dopaminérgica ¹¹³. La variante homocigota AA para dicho SNP, se asocia de forma significativa ($p < 0.001$) al grupo de fumadores que consumen ≥ 20 cpd (OR= 1.81); se ha propuesto que dicho cambio afecta de forma significativa la señalización cerebral de sujetos consumidores de tabaco, observando cambios en las regiones del estriado ventral, la amígdala e hipocampo ¹¹⁴. Janes en 2011 sugiere que los fumadores que presentan la variante A del rs16969968 son más propensos a tener recuerdos asociados al consumo de cigarro, y plantea que el alelo A tiene una función importante en el proceso de memoria ¹¹⁶. En 2011 Grucza incorpora a la adicción a la nicotina la interacción con múltiples genes, en cuanto a los nAChR encuentran asociación significativa con 3 SNP de *CHRNA5* de los cuales el rs16969968 y rs578776 ya se habían reportado anteriormente en al menos dos poblaciones diferentes ¹¹⁷. Mientras que en población europea se encuentra evidencia en SNP que forman haplotipos dentro del grupo de genes *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* asociados al riesgo a adicción a la nicotina ¹¹⁸, nuestros resultados no mostraron haplotipos asociados, esto es una evidencia más de que la distribución en la población de estas variables genéticas presenta diferente desequilibrio de ligamiento según la población analizada y podría estar afectando el patrón en el consumo de cigarro. Previamente se reportó que la isoforma corta de la neurexina 1 interacciona con el nAChR $\alpha 4\beta 2$ concentrándolo en las terminales presinápticas de las neuronas ¹³⁹. Se conoce poco sobre el mecanismo en que la forma larga y la forma corta de la neurexina son reguladas para generar cientos de isoformas, pero es posible que ciertos SNP puedan regular dicho proceso y como consecuencia afecten el nivel de expresión de la neurexina. Por otro lado, nuestro análisis aporta nuevas hipótesis sobre la posible

generación de miRNAs en las regiones que contienen los SNP asociados en el gen *NRXN1*, los cuales podrían estar regulando vías involucradas en el proceso de adicción a la nicotina y podrían diferir cuando estuviera presente en la secuencia del miRNA con el alelo de riesgo. Estos cambios en el silenciamiento de la expresión de ciertas proteínas podrían alterar la comunicación en vías cerebrales relacionadas con la adicción a la nicotina.

Entre las limitantes del estudio se encuentran: el grupo de fumadores activos auto reportaron el consumo de cigarro, lo ideal hubiera sido tener valores de cotinina para cada individuo incluido en el estudio. Esto es relevante porque la forma de fumar cigarros es diferente, depende de la persona, así como del tipo de cigarro consumido y esto en conjunto afecta la cantidad de nicotina que ingresa en el organismo. En nuestro estudio no fueron consideradas las variantes genéticas reportadas en los genes que participan en el metabolismo de la nicotina (*CYP2A6*, *CYP2B6*)^{140, 141} que pueden estar afectando el metabolismo de la nicotina. Finalmente, no fue evaluada la interacción entre los genes estudiados y los factores del medio ambiente relacionados al consumo de cigarro.

Es deseable que el análisis in silico se compruebe posteriormente, para ello se requiere contar con un modelo en cultivo celular y generar los plásmidos adecuados para que posteriormente sea evaluada la expresión de los genes que fueron reportados como posibles blancos de los miRNA generados in silico, hoy en día la regulación de genes por parte de RNAs pequeños ha tomado importancia sobre todo en enfermedades complejas como la adicción a la nicotina^{142, 143}.

Sin embargo, a pesar de nuestras limitantes este es uno de los primeros estudios realizado en población mestiza mexicana que evalúa la participación de los polimorfismos en los genes de neurexina 1 y nicotínicos colinérgicos que previamente han sido evaluados en otras poblaciones; en resumen, el presente trabajo muestra que en los fumadores mestizos mexicanos participan de forma importante los polimorfismos ubicados en *NRXN1* y *CHRNA5* en el consumo elevado de cigarro.

7.0 Conclusiones

- En población mestiza mexicana existen marcadores genéticos de riesgo para consumir mayor cantidad de cigarros en los genes *NRXN1* (rs985919, C y rs1882296, C) y *CHRNA5* (rs16969968, A y rs17408276, C).
- En individuos fumadores mestizos mexicanos existe un marcador genético tipo SNP en el gen *NRXN1* (rs10865246, C) asociado con mayor grado de adicción a la nicotina.
- La presencia del SNP rs1882296 [T/C] en el gen *NRXN1*, localizado en región intrónica, podría estar formando parte de secuencias que codifican para miRNAs (Hsa-miR-6740-5p/Hsa-miR-6866-5p), probablemente afectando vías cerebrales como la glutamatérgica y GABAérgica involucrados en mecanismos de adicción a la nicotina.

8.0 Literatura citada

1. Organización Mundial de la Salud. *Iniciativa Liberarse Del Tabaco*, 2015.; 2015. http://www.who.int/tobacco/health_priority/es/.
2. Departamento de Investigación para el Control del Tabaco del Instituto Nacional de Salud Pública. *Proyecto de La Encuesta Global de Tabaquismo En Adultos (GATS) México 2014.*; 2014. <http://www.controltabaco.mx/proyectos/gats-mexico-2014>.
3. Secretaría de Salud. *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco.*; 2011. www.conadic.gob.mx.
4. Benowitz NL Hukkanen J Jacob P 3rd. Nicotine chemistry metabolism kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;29-60.
5. Dierker LC, Donny E, Tiffany S et al. Tobacco Etiology Research Network. The association between cigarette smoking and DSM-IV nicotine dependence among first year college students. *Drug Alcohol Depend*. 2007;86(2-3):106-114.
6. Zieher LM GL. Bases neurobiológicas de la adicción a la nicotina. *Psicofarmacología*. 2005;5:30.
7. Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL et al. Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:3517-3525.
8. Bierut LJ, Madden PA, Breslau N et al. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet*. 2007;16:24-35.
9. OMS. *Gender, Women, and the Tobacco Epidemic.*; 2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599511_eng.pdf.
10. Organización Panamericana de la Salud. *Informe Sobre Control de Tabaco Para La Región de Las Américas*. Washington, DC; 2013.
11. Reynales-Shigematsu LM, Rodríguez-Bolaños R, Ortega-Ceballos P, Flores Escartín MG, Lazcano-Ponce E H-ÁM. *Encuesta de Tabaquismo En Jóvenes*. México, D. F.; 2011.
12. Lando HA, Hipple BJ, Muramoto M, Klein JD, Prokhorov AV, Ossip DJ et al. *El Tabaco Es Un Problema Que Afecta a Los Niños En El Mundo Entero.*; 2010.
13. Reynales-Shigematsu LM, Vázquez-Grameix JH L-PE. *Encuesta Mundial de Tabaquismo En Estudiantes de La Salud*. México, D. F.; 2006.
14. Reynales Shigematsu LM, Thrasher JF, Lazcano Ponce E H-ÁM. *Salud Pública Y Tabaquismo, Volumen I. Políticas Para El Control Del Tabaco En México*. Cuernavaca, México; 2013.
15. Díaz, J.L. PRC y RKS. On the Use of Tagetes lucida and Nicotiana rustica as a Huichol Smoking Mixture: the Aztec Yahuítli with Suggestive Hallucinogenic Effects. *Econ Bot*. 1977;31:16-23.
16. Charlton A. Medicinal uses of tobacco in history. *J R Soc Med*. 2004;97(6):292-296.
17. Moreno-Coutiño y Coutiño Bello. Nicotiana tabacum L., usos y percepciones. *Etnobiología*. 2012;10(2).
18. Pascual PF y SV. Aspectos históricos, sociales y económicos del tabaco. *Adicciones*. 2004;16(2):13-24.
19. Rubio M H y Rubio M A. Breves comentarios sobre la historia del tabaco y tabaquismo. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex*. 2006;19(4):297-300.
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Perspectivas a Plazo Medio de Los Productos Básicos Agrícolas.*; 2003. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s19.htm> .
21. Meneses-González, F., M. Márquez-Serrano, J. Sepúlveda-Amor et al. La industria tabacalera en México. *Salud Pública de México*. 2002;44(1):161-169.
22. Madera PJ. El cultivo de tabaco en Nayarit. *Converg Ciencias Soc*. 2003;10(31):223-250.

23. Organización Mundial de la Salud. *Tabaco: Mortífero En Todas Sus Formas.*; 2006. http://www.who.int/tobacco/resources/publications/wntd/2006/translations/Brochure_Spanish.pdf.
24. Ruiz A M, Gómez I R, Rubio C, Revert C et al. Efectos tóxicos del tabaco. *Rev Toxicol.* 2004;(21):64-71.
25. Wickham RJ. How Menthol Alters Tobacco-Smoking Behavior : A Biological Perspective EXPERIENCE OF SMOKING TOBACCO. 2015;88:279-287.
26. Ashoor A, Nordman JC, Veltri D, Yang KH, Al Kury L, Shuba Y, Mahgoub M, Howarth FC, Sadek B, Shehu A, Kabbani N OM. Menthol binding and inhibition of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One.* 2013;8(7):e67674.
27. Hecht SS, Murphy SE, Carmella SG, et al. Similar uptake of lung carcinogens by smokers of regular, light, and ultralight cigarettes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(3):693-698. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0542.
28. Regan AK, Promoff G, Dube SR AR. Electronic nicotine delivery systems: adult use and awareness of the “e-cigarette” in the USA. *Tob Control.* 2013;22(1):19-23.
29. Buljubasich D. E-Cigarette: a modern Trojan horse? *Arch Bronconeumol.* 2015;51(7):313-314.
30. Organización Mundial de la Salud. *Los Distribuidores de Cigarrillos Electrónicos Deben Dejar de Reivindicar Efectos Terapéuticos No Demostrados.*; 2008. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2008/pr34/es/>.
31. Bertholon JF, Becquemin MH, Roy M, Roy F, Ledur D, Annesi Maesano I DB. Comparison of the aerosol produced by electronic cigarettes with conventional cigarettes and the shisha. *Rev Mal Respir.* 2013;30(9):752-757.
32. Wu Q, Jiang D, Minor M CH. Electronic cigarette liquid increases inflammation and virus infection in primary human airway epithelial cells. *PLoS One.* 2014;9(9):e108342.
33. Pankow JF. A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(11):1465-1481.
34. Dempsey D, Jacob P 3rd BN. Nicotine metabolism and elimination kinetics in newborns. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67(5):458-465.
35. Dempsey DA BN. Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 2001;24(4):277-322.
36. Rose JE, Behm FM, Westman EC CR. Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend.* 1999;56(2):99-107.
37. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):79-115. doi:10.1124/pr.57.1.3.
38. Earla R, Ande A, McArthur C, Kumar A KS. Enhanced nicotine metabolism in HIV-1-positive smokers compared with HIV-negative smokers: simultaneous determination of nicotine and its four metabolites in their plasma using a simple and sensitive electrospray ionization liquid chromatography-tandem mass. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(9):1596-1598.
39. Pogun S, Yazarbas G. Sex differences in nicotine action. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;192:261-291. doi:10.1007/978-3-540-69248-5_10.
40. National Institute on Drug Abuse. *Las Drogas, El Cerebro Y El Comportamiento: La Ciencia de La Adicción.* Estados Unidos; 2008. <http://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/las-drogas-el-cerebro-y-el-comportamiento>.
41. American Society of Addiction Medicine (ASAM). *Public Policy Statement: Definition of Addiction.*; 2011.
42. Skjei KL MA. Effects of repeated withdrawal episodes, nicotine dose, and duration of nicotine exposure on the severity and duration of nicotine withdrawal in rats. *Psychopharmacol.*

- 2003;168(3):280-292.
43. Organización Mundial de la Salud. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines.*; 1992.
 44. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. (DSM-IV).* Washington, DC,; 1994.
 45. Blasco J., Martínez-Raga J., Carrasco et al. Atención y craving o ganas compulsivas. Avances en su conceptualización y su implicación en la prevención de recaídas. *Adicciones.* 2008;20:365-376.
 46. Kober H, Kross EF, Mischel W, Hart CL OK. Regulation of craving by cognitive strategies in cigarette smokers. *Drug Alcohol Depend.* 2010;106(1):52-55.
 47. Meneses-Gaya IC, Zuardi AW, Loureiro SR et al. Psychometric properties of the Fagerström Test for Nicotine Dependence. *J Bras Pneumol.* 2009;35(1):73-82.
 48. Pérez-Ríos M, Santiago-Pérez MI, Alonso B, Malvar a, Hervada X, de Leon J. Fagerstrom test for nicotine dependence vs heavy smoking index in a general population survey. *BMC Public Health.* 2009;9:493. doi:10.1186/1471-2458-9-493.
 49. Brook JS, Koppel J PK. Predictors of DSM and Fagerstrom-defined nicotine dependence in African American and Puerto Rican young adults. *Subst Use Misuse.* 2009;44(6):809-822.
 50. Baker TB, Breslau N, Covey L, Shiffman S. DSM criteria for tobacco use disorder and tobacco withdrawal: A critique and proposed revisions for DSM-5. *Addiction.* 2012;107(2):263-275. doi:10.1111/j.1360-0443.2011.03657.x.
 51. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Ed.* Washington, D.C; 2013.
 52. Amos CI, Spitz MR CP. Chipping away at the genetics of smoking behavior. *Nat Genet.* 2010;42(5):366-368.
 53. Okuyemi KS, Pulvers KM, Cox LS, Thomas JL, Kaur H, Mayo MS, Nazir N, Etter JF AJ. Nicotine dependence among African American light smokers: a comparison of three scales. *Addict Behav.* 2007;32(10):1989-2002.
 54. Strasser AA, Pickworth WB, Patterson F LC. Smoking topography predicts abstinence following treatment with nicotine replacement therapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(11 Pt1):1800-1804.
 55. Jiloha RC. Biological basis of tobacco addiction: Implications for smoking-cessation treatment. *Indian J Psychiatry.* 2010;52(4):301-307.
 56. George TP, Verrico CD, Picciotto MR RR. Nicotinic modulation of mesoprefrontal dopamine neurons: pharmacologic and neuroanatomic characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(1):58-66.
 57. Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL Z V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2000;22(5):451-465.
 58. Sieminska A, Buczkowski K, Jassem E et al. Lack of association between serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR and smoking among Polish population: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2008;9:76.
 59. Secko D. Craving nicotine: It's in the genes. *CMAJ.* 2005;172(2):175-176.
 60. Lukas RJ, Changeux JP, Le Noveré N et al. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 1999;51(2):397-401.
 61. Changeux J-P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(6):389-401. doi:10.1038/nrn2849.
 62. Wanamaker CP GW. N-linked glycosylation is required for nicotinic receptor assembly but not for subunit associations with calnexin. *J Biol Chem.* 2005;280(40):33800-33810.
 63. Zhu D, Xiong WC ML. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci.* 2006;26(18):4841-4851.

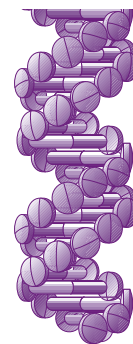
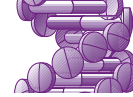
64. Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K TS. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life*. 2009;61(4):407-423.
65. Ensembl Project. Ensembl Project. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/.
66. Lynagh T, Lynch JW. Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Front Mol Neurosci*. 2012;5(May):1-11. doi:10.3389/fnmol.2012.00060.
67. Bruneau E, Sutter D, Hume RI et al. Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci*. 2005;25(43):9949-9959.
68. Yakel JL. Gating of nicotinic ACh receptors: latest insights into ligand binding and function. *J Physiol*. 2010;588(Pt 4):597-602. doi:10.1113/jphysiol.2009.182691.
69. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(2):102-114.
70. Dellisanti CD, Yao Y, Stroud JC, Wang ZZ CL. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat Neurosci*. 2007;10(8):953-962.
71. Gay EA YJ. Gating of nicotinic ACh receptors; new insights into structural transitions triggered by agonist binding that induce channel opening. *J Physiol*. 2007;584(Pt 3):727-733.
72. Henchman RH, Wang HL, Sine SM et al. Ligand-induced conformational change in the alpha7 nicotinic receptor ligand binding domain. *Biophys J*. 2005;88(4):2564-2576.
73. Dajas-Bailador F WS. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(6):317-324.
74. Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):237-246. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.041.
75. Moroni M, Zwart R, Sher E, Cassels BK Bl. alpha4 beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol*. 2006;70(2):755-768.
76. Dani JA BD. Historical and current perspective on tobacco use and nicotine addiction. *Trends Neurosci*. 2011;34(7):383-392.
77. Srinivasan R, Pantoja R, Moss FJ, et al. Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *J Gen Physiol*. 2011;137(1):59-79. doi:10.1085/jgp.201010532.
78. Brown RW, Collins AC, Lindstrom JM WP. Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem*. 2007;103(1):204-215.
79. Dao DQ, Perez EE, Teng Y, Dani JA DBM. Nicotine enhances excitability of medial habenular neurons via facilitation of neurokinin signaling. *J Neurosci*. 2014;34(12):4273-4284.
80. Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Tomasi D. Addiction circuitry in the human brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52(2):321-336. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134625.
81. O'Brien CP. Neuroplasticity in addictive disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(3):350-353.
82. De Biasi M DJ. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:105-130.
83. Benowitz N. Nicotine Addiction. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2295-2303. doi:10.1056/NEJMr0809890.Nicotine.
84. Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ BM. DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci*. 2005;21(10):2817-2824.

85. Hogle JM, Kaye JT CJ. Nicotine withdrawal increases threat-induced anxiety but not fear: neuroadaptation in human addiction. *Biol Psychiatry*. 2010;68(8):719-725.
86. Matta SG, Foster CA SB. Nicotine stimulates the expression of cFos protein in the parvocellular paraventricular nucleus and brainstem catecholaminergic regions. *Endocrinology*. 1993;132(5):2149-2156.
87. Micó JA, Moreno MR, Roca A, Rojas MO OA. Neurobiología de la adicción a la nicotina. *Prevención del Tab*. 2000;2:101-105.
88. Hikosaka O. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(7):503-513.
89. Rezvani K, Teng Y, Shim D DBM. Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity. *J Neurosci*. 2007;27(39):10508-10519.
90. Granda J, Solano S, Jareño J, Pérez A, Barrueco M JC. De la neurobiología de la adicción a la nicotina al tratamiento del tabaquismo. *Progresos terapéuticos. Prevención del Tab*. 2006;8:116-128.
91. Fernández-Espejo E. Neurobiological basis of drug addiction. *Rev Neurol*. 2002;34(7):659-664.
92. Craig AM KY. Neurexin-neuroigin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(1):43-52.
93. Berninghausen O, Rahman MA, Silva JP, Davletov B, Hopkins C, Ushkaryov Y a. Neurexin I beta and neuroigin are localized on opposite membranes in mature central synapses. *J Neurochem*. 2007;103(5):1855-1863. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04918.x.
94. M. M, Südhof TC. Neurexins : three genes and 100lproducts. *Tig*. 1997;14(1):59-63.
95. Lisé MF, El-Husseini a. The neuroigin and neurexin families: From structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(16):1833-1849. doi:10.1007/s00018-006-6061-3.
96. Sheckler LR, Henry L, Sugita S, Südhof TC, Rudenko G. Crystal structure of the second LNS/LG domain from neurexin 1 α : Ca²⁺ binding and the effects of alternative splicing. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22896-22905. doi:10.1074/jbc.M603464200.
97. Boardman JD, Blalock CL, Pampel FC. Trends in the genetic influences on smoking. *J Health Soc Behav*. 2010;51(1):108-123. doi:10.1177/0022146509361195.
98. Silverman EK PL. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(6):645-648.
99. Jimenez-Sanchez G, Silva-Zolezzi I, Hidalgo A MS. Genomic medicine in Mexico: initial steps and the road ahead. *Genome Res*. 2008;18(8):1191-1198.
100. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet*. 2010;42(5):436-440. doi:10.1038/ng.572.
101. Tobacco T, Consortium G. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet*. 2010;42(5):441-447. doi:10.1038/ng.571.
102. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, et al. Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet*. 2010;42(5):448-453. doi:10.1038/ng.573.
103. Lou XY, Ma JZ, Sun D, Payne TJ LM. Fine mapping of a linkage region on chromosome 17p13 reveals that GABARAP and DLG4 are associated with vulnerability to nicotine dependence in European-Americans. *Hum Mol Genet*. 2007;16(2):142-153.
104. Chu SL, Xiao D, Wang C JH. Association between 5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region and smoking behavior in Chinese males. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(12):1365-1368.
105. Mobascher A, Rujescu D, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Nitz B et al. Association of a variant in the muscarinic acetylcholine receptor 2 gene (CHRM2) with nicotine addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153B(2):684-690.
106. Shields PG, Lerman C, Audrain J, Bowman ED, Main D, Boyd NR et al. Dopamine D4

- receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(6):453-458.
107. Perkins KA, Lerman C, Grottenthaler A, Ciccocioppo MM, Milanak M, Conklin CA et al. Dopamine and opioid gene variants are associated with increased smoking reward and reinforcement owing to negative mood. *Behav Pharmacol.* 2008;19(5-6):641-649.
 108. Sieminska A, Buczkowski K, Jassem E, Niedoszytko M TE. Influences of polymorphic variants of DRD2 and SLC6A3 genes, and their combinations on smoking in Polish population. *BMC Med Genet.* 2009;10:92.
 109. Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF et al. The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res.* 2009;69(17):6848-6856.
 110. Li MD, Yoon D, Lee JY, et al. Associations of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster with smoking behaviors in a Korean population. *PLoS One.* 2010;5(8). doi:10.1371/journal.pone.0012183.
 111. Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C CH et al. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry.* 2008;13(4):368-373.
 112. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PA et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet.* 2007;16(1):36-49.
 113. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry.* 2008;165(9):1163-1171.
 114. Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, Chabrier A, Hung RJ, Boffetta P et al. Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *Int J Epidemiol.* 2010;39(2):563-577.
 115. Hong LE, Hodgkinson C a, Yang Y, et al. A genetically modulated, intrinsic cingulate circuit supports human nicotine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(30):13509-13514. doi:10.1073/pnas.1004745107.
 116. Janes AC, Smoller JW, David SP, Frederick BD, Haddad S, Basu A et al. Association between CHRNA5 genetic variation at rs16969968 and brain reactivity to smoking images in nicotine dependent women. *Drug Alcohol Depend.* 2012;120(1-3):7-13.
 117. Grucza R, Johnson E, Krueger R. Incorporating age at onset of smoking into genetic models for nicotine dependence: evidence for interaction with multiple genes. *Addict* 2010;15(3):346-357. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00220.x.Incorporating.
 118. Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009;150B(4):453-466.
 119. Saccone NL, Schwantes-An TH, Wang JC, et al. Multiple cholinergic nicotinic receptor genes affect nicotine dependence risk in African and European Americans. *Genes, Brain Behav.* 2010;9(7):741-750. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00608.x.
 120. Nussbaum J, Xu Q, Payne TJ, et al. Significant association of the neurexin-1 gene (NRXN1) with nicotine dependence in European- and African-American smokers. *Hum Mol Genet.* 2008;17(11):1569-1577. doi:10.1093/hmg/ddn044.
 121. Kelai S, Maussion G, Noble F, et al. Nrnx3 upregulation in the globus pallidus of mice developing cocaine addiction. *Neuroreport.* 2008;19(7):751-755. doi:10.1097/WNR.0b013e3282fda231.
 122. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR BM. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(2):209-213.

123. Barrret JC, Fry B, Maller J DM. Haploview 4.2. 2005. <http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>.
124. International HapMap Project. 2012. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>.
125. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8611-8616.
126. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras AV et al. H genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*. 2014;344(6189):1280-1285.
127. Patterson N, Price AL, Reich D. Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genet*. 2006;2(12):e190.
128. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW DM& SP. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet*. 2007;81.
129. Organización Panamericana de la Salud S de I sobre SP. Epidat 3.1. 2000.
130. Reumers J1, Conde L, Medina I, Maurer-Stroh S, Van Durme J, Dopazo J, Rousseau F SJ. Joint annotation of coding and non-coding single nucleotide polymorphisms and mutations in the SNPEffect and PupaSuite databases. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D825-D829.
131. Xiaowei Wang. miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. 2008;14(6):1012-1017.
132. Kozomara A G-JS. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. 2014:D68-D73.
133. Chen LS, Baker TB, Grucza R, et al. Dissection of the phenotypic and genotypic associations with nicotinic dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012;14(4):425-433. doi:10.1093/ntr/ntr231.
134. Killen JD, Fortmann SP, Telch MJ NB. Are heavy smokers different from light smokers? A comparison after 48 hours without cigarettes. *JAMA*. 1988;260(11):1581-1585.
135. Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: A meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet*. 2010;6(8). doi:10.1371/journal.pgen.1001053.
136. Lessov-Schlaggar CN, Pang Z, Swan GE, Guo Q, Wang S, Cao W et al. Heritability of cigarette smoking and alcohol use in Chinese male twins: the Qingdao twin registry. *Int J Epidemiol*. 2006;35(5):1278-1285.
137. Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y LJ. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 2003;63(2):332-341.
138. Tapia L, Kuryatov A LJ. Ca²⁺ permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 2007;71(3):769-776.
139. Cheng SB, Amici SA, Ren XQ, McKay SB, Treuil MW, Lindstrom JM et al. Presynaptic targeting of alpha4beta 2 nicotinic acetylcholine receptors is regulated by neurexin-1beta. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23251-23259.
140. Yoshida R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon JT YT. Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54(5):511-517.
141. Gambier N, Batt AM, Marie B, Pfister M, Siest G V-SS. Association of CYP2A6*1B genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort. *Pharmacogenomics J*. 2005;5(4):271-275.
142. Huang W LM. Differential allelic expression of dopamine D1 receptor gene (DRD1) is modulated by microRNA miR-504. *Biol Psychiatry*. 2009;65(8):702-705.
143. Fan Z, Chen X, Chen R. Transcriptome-wide analysis of TDP-43 binding small RNAs

identifies miR-NID1 (miR-8485), a novel miRNA that represses NRXN1 expression. *Genomics*. 2014;103(1):76-82. doi:10.1016/j.ygeno.2013.06.006.



SNPs in *NRXN1* and *CHRNA5* are associated to smoking and regulation of GABAergic and glutamatergic pathways

Aim: To identify genetic variants associated with greater tobacco consumption in a Mexican population. **Patients & methods:** Daily smokers were classified as light smokers (LS; n = 742), heavy smokers (HS; n = 601) and nonsmokers (NS; n = 606). In the first stage, a genotyping microarray that included 347 SNPs in *CHRNA2-CHRNA7/CHRNA10*, *CHRNA2-CHRNA4* and *NRXN1* genes and 37 ancestry-informative markers was used to analyze 707 samples (187 HS, 328 LS and 192 NS). In the second stage, 14 SNPs from stage 1 were validated in the remaining samples (HS, LS and NS; n = 414 in each group) using real-time PCR. To predict the role of the associated SNPs, an in silico analysis was performed. **Results:** Two SNPs in *NRXN1* and two in *CHRNA5* were associated with cigarette consumption, while rs10865246/C (*NRXN1*) was associated with high nicotine addiction. The in silico analysis revealed that rs1882296/T had a high level of homology with Hsa-miR-6740-5p, which encodes a putative miRNA that targets glutamate receptor subunits (*GRIA2*, *GRID2*) and GABA receptor subunits (*GABRG1*, *GABRA4*, *GABRB2*), while rs1882296/C had a high level of homology with Hsa-miR-6866-5p, which encodes a different miRNA that targets *GRID2* and *GABRB2*. **Conclusion:** In a Mexican Mestizo population, greater consumption of cigarettes was influenced by polymorphisms in the *NRXN1* and *CHRNA5* genes. We proposed new hypotheses regarding the putative roles of miRNAs that influence the GABAergic and glutamatergic pathways in smoking addiction.

First draft submitted: 4 February 2016; Accepted for publication: 25 April 2016; Published online: 29 June 2016

Keywords: *CHRNA5* • genetic • nicotine addiction • *NRXN1*

Tobacco consumption is a worldwide epidemic. Many countries have reported an increase in consumption rates, particularly in adolescents and women, and a decrease in the age at initiation [1]. Current trends indicate that by the year 2020, more than 10 million people will die from cardiovascular diseases, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and pulmonary cancer caused by tobacco [2–4]. In Mexico, the prevalence of active cigarette consumption is 21.7% in those 12–65 years of age. On average, this population initiates consumption at 20.4 years old and smokes 6.5 cigarettes per day (cpd). A total of 11.4% of active smokers

are addicted to cigarettes, and 58.4% of smokers have attempted to stop smoking [5]. However, the success of smoking-cessation therapy, reported as the percentage of abstinence after 1 year, is 35% [6]. The main addictive component of tobacco is nicotine [7], which exerts its effect on the central nervous system by binding to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) [8], causing changes in the liberation of neurotransmitters in the nucleus accumbens, which affects various cerebral circuits responsible for drug reinforcement [9,10], the constant search for this substance and the change in cerebral plasticity [11]. The main associ-

Gloria Pérez-Rubio^{1,2,3},
Martha E Pérez-Rodríguez²,
Juan Carlos Fernández-López⁴,
Alejandra Ramírez-Venegas⁵,
Jesús García-Colunga⁶,
Federico Ávila-Moreno⁷, Angel
Camarena³, Raúl H Sansores^{*5}
& Ramcés Falfán-Valencia^{**1}

¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Laboratorio HLA, México, DF, México

²Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, CMN S-XXI, México, DF, México

³Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado en Ciencias Biológicas, México, DF, México

⁴Instituto Nacional De Medicina Genómica, Departamento de Genómica Computacional, México, DF, México

⁵Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Departamento de Investigación en Tabaquismo y EPOC, México, DF, México

⁶Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Juriquilla, Querétaro, Mexico

⁷Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores (FES)-Iztacala, Biomedicine Research Unit (UBIMED), Cancer Epigenomics Laboratory 12, Tlalnepantla, México, México

*Author for correspondence:
rfalfanv@iner.gob.mx

**Author for correspondence:
raulsansores@yahoo.com.mx

ated phenotype that predicts the degree of nicotine addiction is the quantity of cpd [12]. Heavy smokers (HS; ≥ 20 cpd) present a greater degree of addiction, greater difficulty stopping smoking, more withdrawal and tolerance symptoms and higher scores on the Fagerström questionnaire compared with light smokers (LS; < 10 cpd) [13,14]. Family and identical twin studies have shown that genetic factors contribute to the risk of consuming tobacco [15,16], with heritability estimations between 40% and 70% [17]. Using genome-wide studies, SNPs associated ($p < 1E-07$) with the quantity of cpd have been identified. These SNPs are principally located in the genes that encode the nAChR subunits *CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4* and in neurexin 1 (*NRXN1*) [18]. A group of genes that are highly associated with nicotine addiction encodes nAChRs. The receptor with the greatest affinity is formed by the $\alpha 4\beta 2$ subunits, which can present the stoichiometries $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ and $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, of which the first one is more sensitive to nicotine and is found in a greater proportion of individuals who are exposed to nicotine for long periods [19,20]. Associations between nAChR SNPs, nicotine addiction and phenotypes related to cigarette consumption have been reported, particularly in the group of coding genes in chromosome 15 (*CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4*). In 2008, Berrettini *et al.*, who studied a European population, suggested that haplotypes were formed by the *CHRNA5/CHRNA3* genes that predispose an individual to nicotine addiction [21]. Subsequently, in 2008, Stevens *et al.* conducted a study that included LS (< 5 cpd) and HS (> 30 cpd). These researchers found 13 SNPs that were significantly associated with the HS group [22]. Then, in 2009, Saccone *et al.* described five SNPs with significant associations with smoking in the *CHRNA5* gene, 11 SNPs in *CHRNA3* and one associated SNP in *CHRNB4*. These researchers selected individuals with a score from 0 to 1 on the Fagerström questionnaire as the control group, and they selected individuals who scored ≥ 4 for the nicotine-dependent group [23]. In this Korean population, two SNPs within the same genetic region were reported as having an association with the quantity of cigarettes consumed [24]. However, the majority of these studies were conducted in European and Caucasian populations; therefore, the results of these studies cannot be extrapolated to populations with different degrees of racial mixing. Identifying whether polymorphisms associated with addiction in these genes exist in the racially mixed Mexican Mestizo population will validate the previously reported population findings, thus helping to clarify the contribution of genetic factors to nicotine addiction and to increased cigarette consumption.

Patients & methods

Study participants

An analytical, cross-sectional study was conducted. This study including active smokers who had smoked for ≥ 10 years ($n = 1343$) and who were recruited from smoking cessation support clinics of the Department of Smoking and COPD Research of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico. Subjects who were smokers were classified based on their consumption of cpd as follows: LS ($n = 742$), subjects who consumed between 1 and 10 cpd and HS ($n = 601$), subjects who consumed ≥ 20 cpd. We excluded moderate smokers (11–19 cpd) because we were interested in comparing the extreme phenotypes. Smokers, either with symptoms (cough, phlegm, wheezing and shortness of breath) or without symptoms, were invited to undergo spirometry at no cost during the COPD Day and World Smoke-Free Day campaigns using mass media advertisements. All smokers who attended our smoking cessation program were also invited to undergo spirometry.

Additionally, a comparison group was included; this group was composed of nonsmokers (NS; $n = 606$) who were clinically healthy volunteers ≥ 30 years of age and who did not have addictions to alcohol or other illegal drugs.

All participants were Mestizo Mexicans by birth whose parents and grandparents were born in Mexico, who were male or female, who were not biologically related and who did not have a family history of psychiatric diseases or addictions. Subjects without psychiatric illnesses were included and were evaluated by specialized psychologists who applied the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR) criteria.

The participants were invited to participate in the present research study and were informed about the objective of the study. The participants then signed a letter of informed consent and were provided with an assurance-of-personal-data document. Both of these documents were approved by the Research Institute's Committee of Science and Bioethical Research (B20-08). Each participant was assigned an alphanumeric key with the purpose of assuring confidentiality. A 15-ml volume of peripheral blood was obtained using venipuncture techniques and collected in a tube with EDTA as an anticoagulant for subsequent DNA extraction using a BDtract DNA Isolation Kit (Maxim Biotech, CA, USA). The DNA was quantified by ultraviolet absorption at a 260-nm wavelength using a NanoDrop instrument (Thermo Scientific, DE, USA). Contamination with organic compounds and proteins was determined by establishing the relationship between the 260/240 and 260/280 readings, respec-

tively. The samples were considered free of contaminants when the relationship was found to be between 1.7 and 2.0.

Genotyping

Identification of SNPs associated with nicotine addiction in a Mexican Mestizo population was carried out in two stages. In the first stage, fine mapping of genes coding for the subunits of the nicotinic cholinergic receptors (*CHRNA2* to *CHRNA7*, *CHRNA10*, *CHRNB2* to *CHRNB4*) and *NRXN1* gene was performed. In the second stage, those SNPs identified as having a significant association in the first stage were validated using an independent sample.

Stage 1

Microarray design & SNP selection

A GoldenGate genotyping microarray was used on an Illumina platform (Illumina, Inc., CA, USA). In total, 347 SNPs were selected by fine mapping in eleven candidate genes (*CHRNA2* to *CHRNA7*, *CHRNA10*, *CHRNB2* to *CHRNB4* and *NRXN1*) using Haploview 4.2 software [25] and by using information in articles published between 2007 and 2011. TagSNPs were included in the microarray if they had a minor allele frequency (MAF) in the Mexican Mestizo population of $\geq 7\%$ according to the Mexican Genome Diversity Project [26,27].

Selection of ancestry-informative markers

To evaluate the proportion of European and Native American ancestries in individuals participating in our study, we identified 37 ancestry-informative markers (AIMs) that were selected from a panel reported by the Mexican Genome Diversity Project [26,27]. These AIMs were selected using allele frequency differences with $\Delta \geq 0.5$ for pairwise comparisons between ancestral reference populations, specifically, a European population (CEU-HapMap) and a Native American population (Zapotecas [ZAP] from Oaxaca, Mexico). EIGENSOFT v.4.2 software to calculate fixation index (*Fst*) statistics for pairwise populations and to obtain the most informative eigenvector [28].

Genotyping & quality control

Genotyping was conducted using the protocol designed by Illumina for the GoldenGate platform (Illumina, Inc., CA, USA) using a Tecan automated liquid handling system (Tecan, Trading AG, Switzerland), which operates under the Illumina protocol. The microarrays were read on a BeadArray Reader (Illumina, Inc.). Genotype acquisition and documentation generation (.ped and .map files) were conducted using GenomeStudio 2011 v.1.0 software (Illumina,

Inc.). Subjects who did not meet the call rate criteria ($\geq 95\%$) were excluded.

Stage 2

During the validation stage, SNPs that were identified as significantly associated with cigarette smoking or nicotine addiction during stage 1 were genotyped. This validation included the thresholds $p < 0.001$ and odds ratio (OR) ≥ 3.0 for allelic association or genotypic association because the SNPs at this stage required more stringent safeguards [29].

Genotyping was performed using TaqMan allelic discrimination real-time PCR with predesigned probes and a real-time PCR thermocycler (7300 Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, CA, USA). This stage was performed using independent samples with the same characteristics as those samples used in stage 1.

Genotype assignment was performed considering the allelic discrimination and confirmed by absolute quantitation; in addition, three controls without template (contamination controls) were included for each genotyping plate, and 1% of the samples included in the study were genotyped in duplicate as controls for allele assignment. Data interpretation was conducted using Sequence Detection Software (SDS v. 1.4, Applied Biosystems). VIC and FAM fluorophores were used for alleles A and B, respectively.

Statistical analysis

To describe the study population, the statistical program SPSS v.15.0 (SPSS software, IBM, NY, USA) was applied to determine the mean and standard deviation of each variable. To infer the top axes of variation, to estimate the *Fst* and to correct for stratification in the association analysis, we used a 37 AIM panel to genotype smoker and NS samples and performed a principal components analysis using the *smartpca* script implemented in EIGENSOFT v.4.2 software [28]. This analysis included the main ancestral population references for Mexican Mestizos, European and Native Americans ancestries, 60 CEU-Hap Map and 30 ZAP reference samples, respectively. Prior to the allelic association analysis, SNPs in the control group (NS) that did not meet Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) and MAF were excluded. The SNPs that complied with the previously established criteria were analyzed with PLINK 1.07 software [30] employing a logistic regression model (with 1 degree of freedom) that included the following factors as covariates: age, sex and the first three principle components obtained from the principal components analysis to correct for ancestry. To identify genetic markers associated with cigarette consumption, the following comparisons were performed: HS versus

NS and LS versus NS. The HS versus LS comparison sought to establish genetic markers related to the degree of nicotine addiction.

The significance values obtained in each comparison were corrected by the Bonferroni's test. The linkage disequilibrium patterns and associated haplotypes were determined using Haploview 4.2 software [25] with the criteria established by Gabriel *et al.* [31]. For genotypic association analysis, EpiData version 3.1 software was employed [32] using simple 2 × 3 contingency tables, a codominant model and a 95% CI.

In silico analysis & the role of associated SNPs

The SNPs whose associations were validated during stage 2 were evaluated in silico using the Pupasuit 3.1 program [33]. This program can be used to assess the presence of new binding sites for transcription factors and/or the creation or disruption of alternative splicing sites in the gene. To predict potential miRNAs, including the associated SNPs and their potential target genes, the miRDB program was used [34]. We considered only genes (score >80) that are involved in the glutamatergic, GABAergic, serotonergic, dopaminergic and cholinergic pathways, which are the key pathways involved in nicotine addiction. The homology of each predicted miRNA was verified with those reported for humans in miRBase [35], and only those with >80% homology with previously reported miRNAs were considered.

Results

Demographic variables

The demographic variables of the individuals included in both stages are shown in Table 1. The mean age and sex significantly differed between the study groups. Because these variables affect cigarette consumption, they were employed as covariates in the genetic association analysis. The HS had been consuming cigarettes for more years and began at earlier ages compared with LS.

Stage 1

Population ancestry analysis

Population stratification was conducted with 37 AIMs (Supplementary Table 1). For this analysis, the participants were grouped as smokers and controls (NS). When the first two most informative eigenvectors were graphed, the study population was observed to be distributed between both reference populations. The genetic distance, expressed as the *F_{st}* between the populations of NS and smokers, was 0.030. Differences in the allele frequency existed for the AIMs included in the study compared with the *F_{st}* obtained between CEU and ZAP (0.405) (Supplementary Table 2). Consequently, the first three principle components were used as covariates for the association analysis (Figure 1).

Allele, genotype & haplotype association analyses

In total, 347 SNPs (Supplementary Table 3) were included in the genetic association analysis. After genotyping, two SNPs were excluded for having a genotyping success rate <95%. Prior to the association analysis, 24 of the 345 SNPs were excluded for reporting an MAF <7% and for not complying with HWE in the NS group. Ultimately, 321 SNPs that complied with the previously established quality criteria were employed for the association analysis. This analysis was conducted using a logistic regression model employing ancestry, age and sex as covariates.

Table 2 shows the allelic association analysis results obtained for the LS versus NS and HS versus NS comparisons for the nAChR subunits and *NRXN1*. The calculated p-value was corrected using Bonferroni's test. Twenty-one SNPs were identified in six genes with statistically significant differences in frequency. *NRXN1* and *CHRNA5* had the most associated SNPs (7 and 6, respectively). In the comparison between LS versus NS, the p-values were between 7.85E-03 and 5.84E-07, and the ORs were between 2.13 and 4.28. In contrast, in the HS versus NS comparison,

Table 1. Demographic data of the population included in the study.

Variable	Stage 1			Stage 2			p-value
	HS	LS	NS	HS	LS	NS	
n	187	328	192	414	414	414	
Age (mean ± SD); years	53 ± 6	53 ± 10	62 ± 14	57 ± 12	55 ± 14	62 ± 15	<0.001 [†]
Gender (male); %	49	41	17	65	46	14	<0.001 [‡]
Years of smoking (mean ± SD)	34 ± 8	28 ± 11		33 ± 12	30 ± 14		<0.001 [†]
Cpd (mean ± SD)	24 ± 7	6 ± 3		26 ± 11	8 ± 3		<0.001 [†]
Age at onset (mean ± SD); years	17 ± 5	20 ± 7		17 ± 5	18 ± 6		<0.001 [†]

[†]ANOVA analysis.

[‡]χ square test.

Cpd: Cigarettes per day; HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; SD: Standard deviation.

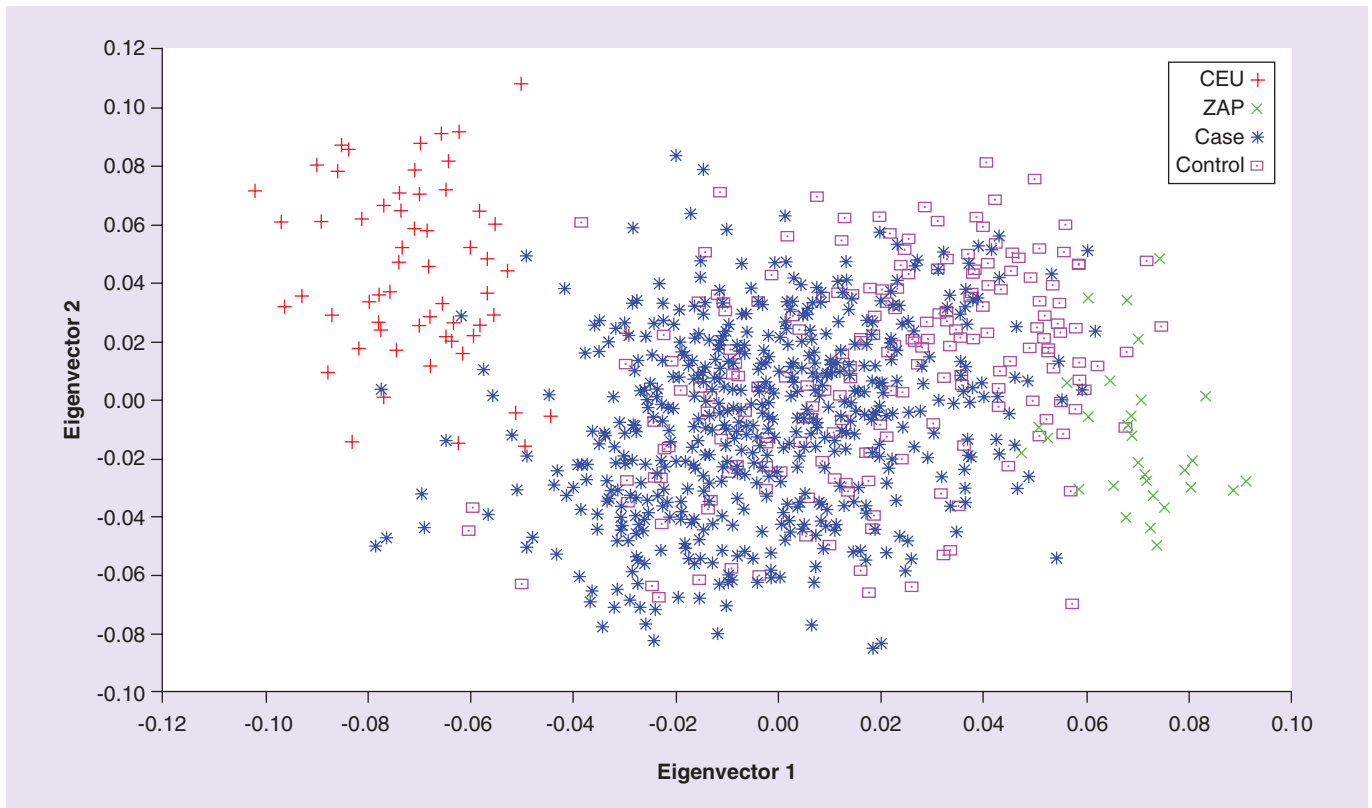


Figure 1. Principal component analysis of the smokers and nonsmokers in this study.

the p -values ranged from $8.23E-04$ to $1.45E-10$ and the ORs were between 2.88 and 7.99. Interestingly, all the SNPs that were found to have an association in the comparison with LS were replicated in the HS versus NS comparison. In addition, the p -values and ORs showed stronger associations. The OR values for each SNP/associated allele in both comparisons are shown in Figure 2. We did not find associated polymorphisms in the *CHRNA2*, *CHRNA4*, *CHRNA6*, *CHRN2* and *CHRN3* genes.

Additionally, we compared the allele frequencies between smokers with different cigarette consumption cut-offs (HS vs LS). A statistically significant association was obtained ($p = 4.26E-03$) for the G allele of the *NRXN1* SNP rs12995085, which was increased in the HS group (24%) compared with the LS group (13%). This finding suggested that this allele was associated with a greater degree of cigarette consumption in a smoking population (OR: 2.18; 95% CI: 1.53–3.11). [Supplementary Table 4](#) shows the allele data for this comparison.

For the 21 reported SNPs with an allelic association, the genotypes were analyzed using a codominant model. The polymorphisms in the *CHRN4*, *CHRNA10* and *CHRNA7* genes were excluded for having weak OR values (<2.0) compared with SNPs in the *NRXN1*, *CHRNA3* and *CHRNA5* genes. The

genotype associations for the HS and LS versus NS comparison are shown in [Table 3](#). In the HS versus NS comparison, for all the SNPs, the association of the homozygotic genotype for the risk allele was greater than that of the heterozygotic genotype. In fact, in five of the seven associated SNPs, the homozygotic genotype for the risk allele had an OR value that was almost double that of the heterozygotic genotype. A similar trend occurred in the LS versus NS comparison. Again, in the majority of associated polymorphisms, the homozygotic genotype for the risk variant presented a doubled risk compared with its heterozygous genotypes.

The HS versus LS genotype analysis showed statistically significant results ($p < 0.001$) for the rs12995085 of *NRXN1*, where the heterozygous genotype (AG) had a frequency of 38.5% in HS and of 25.3% in LS. This factor was associated with the risk (OR: 2.00) of being a HS, and this risk was increased almost four-fold (OR: 7.68) when the homozygotic genotype (GG) was analyzed. This genotype had a frequency of 5.34% in the HS group, whereas it had a frequency of 0.91% in the LS group ([Supplementary Table 4](#)).

The haplotype analysis was conducted for all the SNPs in the 11 genes. The linkage disequilibrium was not high in the genetic regions where the *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRN4* and *NRXN1* genes are situated

Table 2. Stage 1: SNPs and associated alleles in the light smoker versus nonsmoker and heavy smoker versus nonsmoker comparisons.

Gene	SNP	AA	LS vs NS			HS vs NS		
			p-value	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI
<i>NRXN1</i>	rs12995085	G	3.01E-06	4.28	2.23–7.89	1.45E-10	7.99	4.23–15.10
	rs985919	C	5.84E-07	3.11	2.15–4.50	2.15E-08	3.91	2.60–5.90
	rs10189159	C	1.07E-05	3.28	2.15–5.00	3.80E-07	4.19	2.64–6.66
	rs1882296	C	2.22E-04	3.00	1.90–4.41	1.05E-07	4.19	2.68–6.56
	rs7604126	C	1.83E-03	2.37	1.63–3.45	7.36E-05	3.01	1.98–4.58
	rs10865246	C	2.50E-03	2.13	1.53–2.98	4.54E-04	2.48	1.71–3.59
	rs11892200	C	7.85E-03	2.15	1.51–3.08	8.13E-04	2.57	1.73–3.81
<i>CHRNA10</i>	rs2741862	C	7.24E-06	3.99	2.46–6.49	2.43E-06	4.90	2.85–8.40
<i>CHRNA5</i>	rs680244	A	2.91E-05	3.11	2.05–4.72	2.32E-04	3.22	2.02–5.11
	rs951266	T	1.05E-04	3.12	2.01–4.82	1.18E-06	4.25	2.63–6.88
	rs17486278	C	1.21E-04	3.06	1.98–4.71	2.16E-07	4.53	2.80–7.33
	rs16969968	A	1.34E-04	3.00	1.96–4.60	6.73E-05	3.56	2.20–5.75
	rs17408276	C	3.30E-04	3.12	1.97–4.93	4.96E-06	4.27	2.58–7.06
	rs615470	T	4.53E-04	3.00	1.91–4.63	8.23E-04	3.23	1.98–5.26
<i>CHRNA3</i>	rs6495307	T	2.64E-04	2.95	1.92–4.54	1.06E-04	3.43	2.13–5.50
	rs12914385	T	2.97E-04	2.89	1.89–4.43	8.58E-07	4.13	2.59–6.60
	rs1317286	G	3.00E-04	3.00	1.92–4.61	2.24E-06	4.05	2.52–6.51
<i>CHRN4</i>	rs950776	C	1.16E-03	3.11	1.92–5.03	1.29E-04	3.80	2.26–6.37
	rs11072768	G	1.68E-03	2.14	1.54–2.97	6.95E-06	2.87	1.98–4.16
<i>CHRNA7</i>	rs7179008	G	4.08E-05	3.53	2.21–5.64	4.01E-08	5.65	3.33–9.57
	rs2611605	T	4.35E-04	3.37	2.06–5.53	2.48E-04	4.07	2.33–7.10

p-values obtained by χ^2 and after Bonferroni's correction.
 AA: Allele associated; HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; OR: Odds ratio.

($r^2 < 0.8$). We did not find haplotypes associated with the consumption of tobacco in the three comparisons conducted. The haplotype generated in *CHRNA5* is presented in [Supplementary Figure 1](#).

Stage 2

Polymorphisms with values of $p < 0.001$ and $OR \geq 3.0$ in the allelic association analysis (HS vs NS or LS vs NS) or in the genotypic association analysis were chosen. Five SNPs were genotyped in the *NRXN1* gene (rs12995085, rs985919, rs10189159, rs1882296 and rs10865246); six, in *CHRNA5* (rs680244, rs951266, rs17486278, rs16969968, rs17408276 and rs615470); and three, in *CHRNA3* (rs6495607, rs12914385 and rs1317286).

Allelic, genotypic & haplotype associations

Of the 14 SNPs included in the validation, rs12995082 was excluded from the analysis ($MAF < 5\%$) in the NS group. The allelic association analysis of the remaining 13 SNPs to compare HS versus NS, LS versus NS and HS versus LS was performed using a logistic regression

model with age and sex as covariates. [Table 4](#) shows the results of four SNPs with statistically significant associations in the comparisons of LS versus NS and HS versus NS. The C allele of rs10865246, located in the *NRXN1* gene, was found to be associated in the comparison of HS versus LS ($p = 2.79E-02$ after Bonferroni's correction; OR: 1.38; 95% CI: 1.12–1.70).

Genotype analysis was performed using a codominant model. [Table 5](#) shows the results for the comparisons of HS versus NS and LS versus NS. For the HS versus NS comparison, the OR value almost doubled for the genotypes in the *NRXN1* gene (5.78 and 4.07, respectively), and an association with each of the heterozygous genotypes (rs985919/AC and rs1882296/TC) was found (OR: 2.01 and 2.21, respectively). For rs16969968 in *CHRNA5*, genotypes carrying the risk allele (GA, AA) also retained the association described in stage 1 of the analysis, but with lower OR values (2.05 and 2.51, respectively). Interestingly, rs17408276/TC retained the association found in the comparison of LS versus NS at the second stage of the analysis ($p < 0.01$; OR: 1.7),

even with a higher OR value (2.07). A similar trend was observed in the LS versus NS comparison: rs985919 and rs1882296 homozygous genotypes for the risk allele (CC in both cases) had higher OR values (3.66 and 3.51, respectively), and variants located in the *CHRNA5* gene (rs16969968 and rs17408276) showed a modest association (OR: 1.92 and 1.70, respectively) with the heterozygous genotype for each polymorphism.

For the comparison of HS versus LS, a statistically significant association ($p = 0.0005$) was found with the homozygous genotype (CC) of rs10865246 in the *NRXN1* gene (16% [HS] vs 8.3% [LS]; OR: 2.35; 95% CI: 1.48–3.72). Subsequently, a comparison of the variables associated with cigarette smoking (years of smoking, cpd and age of onset of smoking) was performed according to the genotype of each smoker. This analysis compared individuals with a homozygous AA genotype (common genotype) with individuals with AC + CC genotypes (genotypes with allele C, risk). The only statistically significant difference between these individuals was the cpd; subjects homozygous for the common allele had a median of 10 cpd, while individuals with the risk allele had a median of 20 cpd ($p = 0.006$).

The 13 SNPs that were used for the allelic and genotypic association analyses were then used to perform haplotype analysis. However, no linkage disequilibrium was observed between these genetic variants, and no associated haplotypes were found.

Prioritization of SNPs based on functional properties and miRNA target prediction.

Because there is already evidence in the literature of possible biological roles of the identified associations in *CHRNA5*, only SNPs located in the *NRXN1* gene were analyzed. The effect on alternative splicing sites was analyzed using Pupasuit 3.1, and no consequences were found at this level.

miRBase was used to assess the associated alleles; a sequence of 10 bp upstream and 10 bp downstream from the SNP of interest was entered as a query. When rs10865246 was assessed, no target genes were found in the pathways of interest, and potential miRNAs that were generated (with a common or risk allele) had no homology to any previously reported miRNA in humans. We found that rs985919 (with both alleles, common and risk) is part of a sequence of miRNA that potentially targets the genes *GRM5* and *GABRA2*.

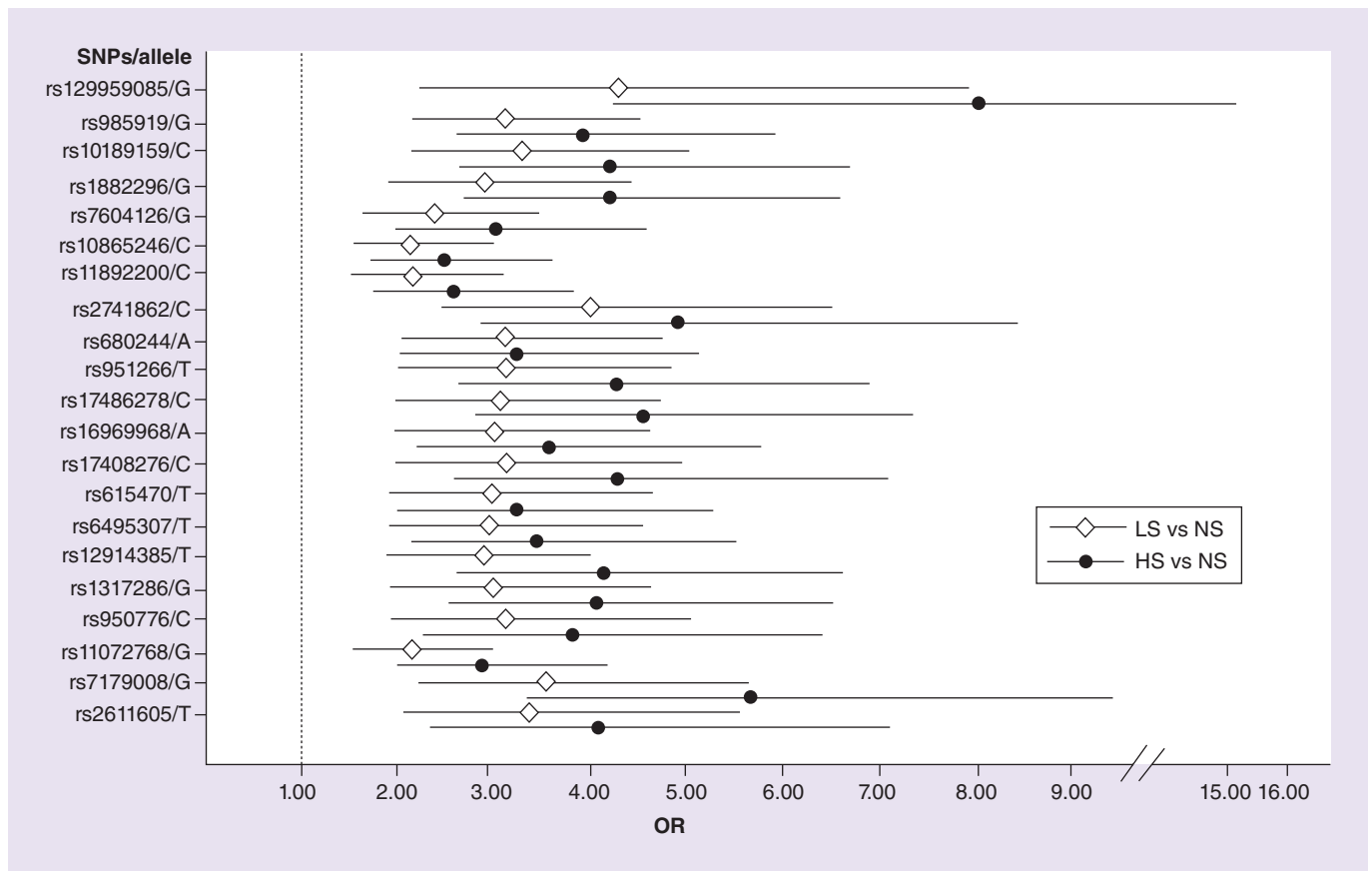


Figure 2. Odds ratio values of both comparisons for each SNPs/associated allele. HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; OR: Odds ratio.

Table 3. Stage 1: SNPs and associated genotypes in the genes *NRXN1*, *CHRNA3* and *CHRNA5*.

Gene	SNP genotype	Genotype frequency (%)			HS vs NS			LS vs NS		
		HS (n = 187)	LS (n = 328)	NS (n = 192)	p-value	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI
<i>NRXN1</i>	rs12995085									
	AA	0.561 (56.1)	0.737 (73.7)	0.916 (91.6)	1.00	1.00		1.00	1.00	
	AG	0.385 (38.5)	0.253 (25.3)	0.083 (8.33)	<0.001	7.54	4.16–16.65	<0.001	3.77	2.13–6.66
	GG	0.053 (5.34)	0.009 (0.91)	0						
	rs985919									
	AA	0.262 (26.2)	0.359 (35.9)	0.656 (65.6)	1.00	1.00		1.00	1.00	
<i>CHRNA3</i>	AC	0.588 (58.8)	0.560 (56.0)	0.307 (30.7)	<0.001	4.79	3.03–7.57	<0.001	3.33	2.26–4.89
	CC	0.149 (14.9)	0.079 (7.9)	0.036 (3.6)		10.28	4.21–25.08		3.96	1.65–9.48
	rs10865246									
AA	0.288 (28.8)	0.350 (35.0)	0.557 (55.7)	1.00	1.00		1.00	1.00		
AC	0.534 (53.4)	0.356 (35.6)	0.385 (38.5)	<0.001	2.67	1.71–4.17	<0.001	2.22	1.52–3.24	
CC	0.176 (17.6)	0.109 (10.9)	0.057 (5.7)		5.94	2.78–12.66		3.04	1.47–6.28	
<i>CHRNA5</i>	rs6495307									
	CC	0.513 (51.3)	0.588 (58.8)	0.822 (82.2)	1.00	1.00		1.00	1.00	
	CT	0.422 (42.2)	0.356 (35.6)	0.166 (16.6)	<0.001	4.06	2.50–6.58	<0.001	2.99	1.92–4.66
	TT	0.053 (5.3)	0.036 (3.6)	0.010 (1.0)		8.22	1.76–38.35		4.91	1.08–22.27
<i>CHRNA5</i>	rs12914385									
	CC	0.454 (45.4)	0.548 (54.8)	0.822 (82.2)	1.00	1.00		1.00	1.00	
	CT	0.459 (45.9)	0.396 (39.6)	0.161 (16.1)	<0.001	5.15	3.16–8.40	<0.001	3.68	2.35–5.75
	TT	0.080 (8.0)	0.039 (3.9)	0.015 (1.5)		9.29	2.61–33.00		3.80	1.06–13.59
	rs680244									
	GG	0.524 (52.4)	0.564 (56.4)	0.822 (82.2)	1.00	1.00		1.00	1.00	
<i>CHRNA5</i>	AG	0.411 (41.1)	0.381 (38.1)	0.161 (16.1)	<0.001	4.00	2.46–6.51	<0.001	3.44	2.20–5.38
	AA	0.058 (5.8)	0.054 (5.4)	0.015 (1.5)		5.91	1.60–21.71		5.12	1.48–17.71
	rs16969968									
	GG	0.545 (54.5)	0.579 (57.9)	0.843 (84.3)	1.00	1.00		1.00	1.00	
GA	0.379 (37.9)	0.359 (35.9)	0.140 (14.0)	<0.001	4.17	2.51–6.93	<0.001	3.72	2.33–5.94	
AA	0.069 (6.9)	0.054 (5.5)	0.015 (1.5)		6.88	1.91–24.74		5.11	1.48–17.67	

p-value by linear trend test.
 HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; OR: Odds ratio.

Table 4. Stage 2: SNPs and associated alleles in the light smoker versus nonsmoker and heavy smoker versus nonsmoker comparisons.

Gene	SNP	AA	LS vs NS			HS vs NS		
			p-value*	OR	95% CI	p-value*	OR	95% CI
NRXN1	rs985919	C	6.95E-02	1.73	1.36–2.20	1.57E-06	2.00	1.54–2.60
	rs1882296	C	2.42E-02	1.53	1.16–2.01	2.24E-05	2.07	1.53–2.79
CHRNA5	rs16969968	A	2.71E-03	1.74	1.29–2.34	3.08E-03	1.76	1.29–2.39
	rs17408276	C	8.26E-03	1.78	1.27–2.48	9.20E-07	2.67	1.86–3.82

*p-values are presented after Bonferroni's correction.

AA: Allele associated; HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; OR: Odds ratio.

However, this sequence is not homologous to any human miRNA reported to date. Finally, two potential miRNAs for rs1882296 were found with different target genes (depending on whether the common or risk allele is on the sequence); both genes possess >80% homology with the human miRNAs reported (Table 6).

Discussion

Various studies in twins have indicated a high heritability of nicotine addiction, which varies depending on the population studied [36]. These reports were mainly conducted in Asian, African–American and Caucasian populations. However, no data exist for populations of Latin Americans, who exhibit different degrees of racial mixing. In the present work, we evaluated population ancestry using 37 AIMs, and we found some small differences in the *Fst* between smokers and NS (*Fst* = 0.030). Consequently, stage 1 of the study considered population ancestry as a covariate to correct for in the allelic association analysis.

In the Mexican Mestizo population, we found and validated two SNPs in *NRXN1* (rs985919 and rs1882296) that were associated with tobacco consumption (LS and HS vs NS). In addition, the C allele of rs10865246 is associated with a high degree of nicotine addiction; its frequency is higher in HS compared with LS (44.4 vs 37.9%). In the genotype analysis, this association was stronger when the homozygous genotype was analyzed (CC, OR: 2.35). Members of this gene family are involved in the process of drug addiction according to results obtained in mouse models that revealed a change in the expression of these genes that was induced upon exposure to drugs [37].

Both polymorphisms associated with increased cigarette consumption (rs985919 and rs1882296) are located in introns (18 and 22, respectively). Using Pupasuit software 3.1, we found that neither of these SNPs are in regions that may affect alternative splicing; however, these SNPs are portions of miRNAs. For rs985919, one miRNA was identified whose target genes (*GRM5* and *GABRA2*) encode subunits of gluta-

mate receptors and GABA; however, there is no difference when the miRNA sequence includes the common or risk allele. The miRNA sequence containing the common allele of rs1882296 has five target genes that encode glutamate receptor subunits (*GRIA2*, *GRID2*) and GABA receptor subunits (*GABRG1*, *GABRA4*, *GABRB2*), has high homology to Hsa-miR-6740-5p. When we attempted to change the common allele sequence for the risk allele, the potential target genes were *GRID2* and *GABRB2*; this sequence has high homology with Hsa-miR-6866-5p. This analysis shows that a nucleotide change in rs1882296 may result in a different miRNA, which would silence different genes depending on the allele present.

No target genes for rs10865246, which is associated with nicotine addiction, were found in pathways of interest, and to date, there are no miRNAs that include this polymorphism reported for humans in miRBase [38]. In 2007, Bierut *et al.* found three SNPs (rs10490162, rs12467557 and rs12623467) in intron 1 of the *NRXN1* gene in Caucasian and Afro–American populations; these SNPs are associated with the development of nicotine dependence [39]. However, only one of the three SNPs (rs10490162) presented significant associations in European–American populations [40].

Our validation stage shows that polymorphisms rs16969968 and rs17408276 of *CHRNA5* are associated with increased consumption of cigarettes. rs16969968 is the most replicated finding (found in our study and in other studies of individuals with European ancestry). The presence of this polymorphism produces a change in the amino acid sequence from aspartic acid (G allele) to asparagine (A allele) in position 398 of the protein, which causes a change in the charge of the second intracellular loop of the $\alpha 5$ subunit [41]. Minor allele (A) of rs16969968 alters the function of the nicotinic cholinergic receptors. In cell assays, changes in the concentration of intracellular calcium are produced when this polymorphism is present. This result provides a possible mechanism by which the decrease in the nicotinic cholinergic receptor function

Table 5. Stage 2: SNPs and associated genotypes in genes *NRXN1* and *CHRNA5*.

Gene	SNP/ genotype	Genotype frequency (%)				HS vs NS			LS vs NS		
		HS (n = 415)	LS (n = 415)	NS (n = 415)	NS (n = 415)	p-value	OR	95% CI	p-value	OR	95% CI
<i>NRXN1</i>	rs985919										
	AA	41.7	48.1	63.4	1				1		
	AC	43.3	40.9	32.7	2.01	<0.0000		1.50–2.69	<0.0000	1.65	1.23–2.20
	CC	15.0	11.0	3.9	5.78			3.27–10.20		3.66	2.03–6.56
	rs1882296										
	TT	57.9	67.1	76.6	1					1	
<i>CHRNA5</i>	rs16969968										
	GG	65.2	68.6	79.8	1					1	
	GA	29.6	29.0	17.6	2.05	<0.0000		1.48–2.84	0.0013	1.92	1.38–2.66
	AA	5.2	2.4	2.6	2.51			1.19–5.27		NSD	
	rs17408276										
	TT	71.9	75.7	84.5	1					1	
TC	25.7	22.4	14.6	2.07	<0.0000		1.46–2.92	0.0014	1.70	1.20–2.43	
CC	2.4	1.9	0.9	NSD					NSD		

HS: Heavy smoker; LS: Light smoker; NS: Nonsmoker; NSD: Nonsignificant data; OR: Odds ratio.

Table 6. Analysis *in silico* which the potential miRNAs generated for the rs1882296 of NRXN1.

Variable	Common allele	Risk allele
miRNA sequence	AGT[T]TGGAATAGAGAAAG	ATAGT[C]TGGAATAGAGA
Potential target genes	<i>GABRB2</i> <i>GRID2</i> <i>GABRG1</i> <i>GRIA2</i> <i>GABRA4</i>	<i>GABRB2</i> <i>GRID2</i>
Human miRNA reported	Hsa-miR-6740-5p	Hsa-miR-6866-5p
Homology (%)	83.4	88.3

The common or risk allele is shown in bold and brackets.

is associated with a significant risk of nicotine addiction. Namely, subjects with the A allele in *CHRNA5* require a greater quantity of nicotine to activate the dopaminergic pathway [42]. The homozygotic variant AA for this SNP is significantly associated ($p < 0.001$) with the group of smokers who consume ≥ 20 cpd (OR: 2.51). This change has also been proposed to significantly affect the brain signaling of tobacco-consuming subjects, with changes observed in the ventral striatum, amygdala and hippocampus [43]. In 2012, Janes suggested that smokers who present the A variant of rs16969968 are more prone to having memories associated with cigarette consumption and hypothesized that allele A has an important role in the memory process [44]. In a meta-analysis of 16 studies regarding nicotine addiction with various phenotypes associated with tobacco consumption, rs16969968 ($p = 5.57E-72$) was again found to be associated with a greater consumption of cpd [18]. In 2011, Gruzca incorporated multiple gene interactions with nicotine addiction. For nAChRs, Gruzca found a significant association with three SNPs of *CHRNA5*, of which rs16969968 and rs578776 had already been reported previously in at least two different populations [45]. In the European population, SNPs were found that form haplotypes within the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* and *CHRNA3-CHRNA6* groups of genes associated with a risk of nicotine addiction [46]. However, our data showed only an association of cigarette smoking with rs17408276 in the intron position. In individuals of African-American and Caucasian-European ancestry, haplotypes of rs615470 and rs16969968 were reported; these haplotypes were associated with the highest number of cpd [47]. Although the linkage disequilibrium was not high in our population, in 2010, Hansen reported high linkage disequilibrium in another block (rs11637635–rs17408276–rs578776–rs16969968) within the same chromosomal region. This linkage disequilibrium, which was observed in

an African-American population, decreases when the African component increases [48]. This evidence suggests that the population distribution of these genetic variants affects the linkage disequilibrium and may have different roles in cigarette consumption.

Our study is the first to evaluate the contribution of genetic variants in the two principle groups of genes associated with nicotine addiction, nicotinic cholinergic receptors and *NRXN1*, in a Mestizo population. A recent study discovered that the short isoform of *NRXN1* interacts with nAChR $\alpha 4\beta 2$, concentrating on the neuron's presynaptic terminals [49]. Little is known regarding the mechanism by which the long and short forms of neurexin are regulated to generate hundreds of isoforms, but it is possible that certain SNPs can regulate this process and consequently affect the level of neurexin expression. Our analysis provides new hypotheses about the presence of miRNAs that may affect pathways involved in the process of nicotine addiction. These changes in protein expression or silencing of certain messenger RNAs may alter the functions mediated by the nAChRs. These processes (protein expression regulation and mRNA silencing) may jointly participate in the nicotine addiction process.

Conclusion

In conclusion, the present investigation of a Mexican Mestizo population revealed that smoking and, in particular, a greater consumption of cigarettes are influenced by polymorphisms in the *NRXN1* and *CHRNA5* genes previously described in other populations, in addition to other variants.

Future perspective

The present manuscript has relevant information that can improve our understanding of the genetic factors associated with smoking. The results of this study contribute to the tobacco-related literature. We identified potential genetic markers in the *NRXN1* and *CHRNA5*

genes that are associated with the consumption of cigarettes and with high addiction to nicotine in a Mexican Mestizo population. Little is known regarding the mechanism by which the long and short forms of neurexin are regulated to generate hundreds of isoforms, but it is possible that certain SNPs can regulate this process and consequently affect the level of neurexin expression. Our study provides new hypotheses about the presence of miRNAs that may affect pathways involved in the process of nicotine addiction. In silico analysis suggested that rs1882296 (*NRXN1*) encodes two potential miRNAs with different target genes in the glutamatergic and GABAergic pathways. Designing biological trials to support these hypotheses and to clarify the roles of these SNPs in the consumption of cigarettes is necessary.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper, please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/pgs-2016-0020

Financial & competing interests disclosure

This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous

University of México (UNAM) of G Pérez-Rubio. G Pérez-Rubio acknowledges the scholarship (number: 225531) and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The participants were invited to participate in the present research study and were informed about the objective of the study. The participants then signed a letter of informed consent and were provided with an assurance-of-personal-data document. Both of these documents were approved by the research institute's Committee of Science and Bioethical Research (B20-08).

Open access

This work is licensed under the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Executive summary

Aim

- Smoking is a worldwide epidemic. Several studies have reported the high heritability of nicotine addiction; however, no data exist for Latin–American populations.
- Our results will help to clarify the contribution of genetic factors to nicotine addiction and the increased consumption of cigarettes in Mexican Mestizo populations.

Methods

- The present study was conducted with smokers who were classified based on their consumption of cigarettes per day (cpd) as light smokers (1–10 cpd, n = 742) and heavy smokers (≥ 20 cpd, n = 601) and nonsmokers (n = 606).
- In the first stage, a genotyping microarray with 384 SNPs including *CHRNA2–CHRNA7*, *CHRNA10*, *CHRN2–CHRN4* and *NRXN1* genes was used to analyze individual samples from smokers and nonsmokers.
- In the second stage, validation of the polymorphisms identified as associated in the first step was performed using allelic discrimination.
- The genetic association analysis was performed using a logistic regression model that included age, sex and ancestry as covariates. To predict the roles of associated SNPs, an in silico analysis was performed.

Results

- The polymorphisms rs985919/C and rs1882296/C (*NRXN1*) and rs16969968/A and rs17408276/C (*CHRNA5*) are associated with cigarette consumption.
- rs10865246/C (*NRXN1*) was associated (p = 2.79E-02 after Bonferroni's correction) with high addiction to nicotine (odds ratio: 1.38; 95% CI: 1.12–1.70).
- In silico analysis showed that the sequence of miRNA including rs1882296/T (common allele) has high homology to Hsa-miR-6740-5p, while rs1882296/C (risk allele) has high homology to Hsa-miR-6866-5p. This finding suggests that regulation by miRNA will be different in those subjects carrying the risk allele compared with those with the common allele.

Conclusion

- In a Mexican Mestizo population, smoking and, in particular, a greater consumption of cigarettes are influenced by the polymorphisms in the *NRXN1* and *CHRNA5* genes.

References

- 1 World Health Organization. WHO report on the world epidemic of smoking (2011). www.who.int/tobacco/global_report/2011/es/
- 2 World Health Organization. World No Tobacco Day (2013). www.who.int
- 3 Center for Disease Control and Prevention. Morbidity and mortality weekly reports (MMWRs). Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States 1997–2001 (2005). www.cdc.gov
- 4 Liu BQ, Peto R, Chen ZM *et al.* Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *BMJ* 317(7170), 1411–1422 (1998).
- 5 Department of Health. National survey of addictions 2011: tobacco report (2011). www.conadic.gob.mx
- 6 Méndez M, Urdapilleta E, Sansores RH, Lara Rivas G, Ramírez-Venegas A, Regalado-Pineda J. Factores que determinan que un paciente ingrese a un programa para dejar de fumar [Factors that determine whether a patient enters a smoking cessation program]. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Mex.* 22(1), 7–13 (2009).
- 7 Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83(4), 531–541 (2008).
- 8 Azam L, Winzer-Serhan UH, Chen Y, Leslie FM. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 444(3), 260–274 (2002).
- 9 Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729 (2007).
- 10 Zhang T, Zhang L, Liang Y, Siapas AG, Zhou FM, Dani JA. Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *J. Neurosci.* 29(13), 4035–4043 (2009).
- 11 Gipson CD, Reissner KJ, Kupchik YM *et al.* Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110(22), 9124–9129 (2013).
- 12 Chen LS, Baker TB, Gruzca R *et al.* Dissection of the phenotypic and genotypic associations with nicotinic dependence. *Nicotine Tob. Res.* 14(4), 425–433 (2012).
- 13 Killen JD, Fortmann SP, Telch MJ, Newman B. Are heavy smokers different from light smokers? A comparison after 48 hours without cigarettes. *JAMA* 260(11), 1581–1585 (1988).
- 14 Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH *et al.* Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet.* 6(8), e1001053 (2010).
- 15 Bierut LJ, Dinwiddie SH, Begleiter H *et al.* Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 55(11), 982–988 (1998).
- 16 Li MD. The genetics of nicotine dependence. *Curr. Psychiatry Rep.* 8(2), 158–164 (2006).
- 17 Rose JE, Broms U, Korhonen T, Dick DM, Kaprio J. Genetics of smoking behavior. In: *Handbook of Behavior Genetics (1st Ed.)*. YK Kim (Ed.). Springer, NY, USA, 411–432 (2009).
- 18 Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat. Genet.* 42(5), 441–447 (2010).
- 19 Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 63(2), 332–341 (2003).
- 20 Tapia L, Kuryatov A, Lindstrom J. Ca²⁺ permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 71(3), 769–776 (2007).
- 21 Berrettini W, Yuan X, Tozzi F *et al.* Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol. Psychiatry* 13(4), 368–373 (2008).
- 22 Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT *et al.* Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17(12), 3517–3525 (2008).
- 23 Saccone NL, Wang JC, Breslau N *et al.* The CHRNA5–CHRNA3–CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African–Americans and in European–Americans. *Cancer Res.* 69(17), 6848–6856 (2009).
- 24 Li MD, Yoon D, Lee JY *et al.* Associations of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster with smoking behaviors in a Korean population. *PLoS ONE* 5(8), e12183 (2010).
- 25 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2), 263–265 (2005).
- 26 Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J *et al.* Analysis of genomic diversity in Mexican mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(21), 8611–8616 (2009).
- 27 Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC *et al.* Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science* 344(6189), 1280–1285 (2014).
- 28 Patterson N, Price AL, Reich D. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2(12), e190 (2006).
- 29 Grimes DA, Schulz KF. False alarms and pseudo-epidemics: the limitations of observational epidemiology. *Obstet. Gynecol.* 120(4), 920–927 (2012).
- 30 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81(3), 559–575 (2007).
- 31 Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296(5576), 2225–2229 (2002).
- 32 Public Health Information Department of the General Public Health Administration of the Health Consulate. (Directorate of Galicia), health analysis and health information systems Unit of the Pan-American Health Organization (OPS-WHO).

- EPIDAT, program for epidemiological analysis of tabulated data. *Version 3*, 1 (2006).
- 33 Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H *et al.* PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res.* 34(Web Server), W621–W625 (2006).
- 34 Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 43(Database), D146–D152 (2015).
- 35 Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36(Database), D154–D158 (2008).
- 36 Lessov-Schlaggar CN, Pang Z, Swan GE *et al.* Heritability of cigarette smoking and alcohol use in Chinese male twins: the Qingdao twin registry. *Int. J. Epidemiol.* 35(5), 1278–1285 (2006).
- 37 Kelai S, Maussion G, Noble F *et al.* Nrnx3 upregulation in the globus pallidus of mice developing cocaine addiction. *Neuroreport* 19(7), 751–755 (2008).
- 38 Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* 22(9), 1634–1645 (2012).
- 39 Bierut LJ, Madden PA, Breslau N *et al.* Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum. Mol. Genet.* 16(1), 24–35 (2007).
- 40 Nussbaum J, Xu Q, Payne TJ *et al.* Significant association of the neurexin-1 gene (*NRXN1*) with nicotine dependence in European- and African-American smokers. *Hum. Mol. Genet.* 17(11), 1569–1577 (2008).
- 41 Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone L *et al.* Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum. Mol. Genet.* 16(1), 36–49 (2007).
- 42 Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC *et al.* Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am. J. Psychiatry* 165(9), 1163–1171 (2008).
- 43 Lips EH, Gaborieau V, McKay JD *et al.* Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *Int. J. Epidemiol.* 39(2), 563–577 (2010).
- 44 Janes AC, Smoller JW, David SP *et al.* Association between *CHRNA5* genetic variation at rs16969968 and brain reactivity to smoking images in nicotine dependent women. *Drug Alcohol Depend.* 120(1), 7–13 (2012).
- 45 Gruzca RA, Johnson EO, Krueger RF *et al.* Incorporating age at onset of smoking into genetic models for nicotine dependence: evidence for interaction with multiple genes. *Addict Biol.* 15(3), 346–357 (2010).
- 46 Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL *et al.* Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (*CHRN*) genes. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 150B(4), 453–466 (2009).
- 47 Li MD, Xu Q, Lou XY, Payne TJ, Niu T, Ma JZ. Association and interaction analysis of variants in *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* gene cluster with nicotine dependence in African and European Americans. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B(3), 745–756 (2010).
- 48 Hansen HM, Xiao Y, Rice T *et al.* Fine mapping of chromosome 15q25.1 lung cancer susceptibility in African-Americans. *Hum. Mol. Genet.* 19(18), 3652–3661 (2010).
- 49 Cheng SB, Amici SA, Ren XQ *et al.* Presynaptic targeting of alpha4beta 2 nicotinic acetylcholine receptors is regulated by neurexin-1beta. *J. Biol. Chem.* 284(35), 23251–23259 (2009).

Suplemento A

Cuestionario de Fagerström (Patrón de consumo)

Pregunta	Respuesta	Puntuación
¿Cuántos cigarros fuma usted al día?	a) 31 o más b) 20 a 30 c) 11 a 20 d) Menos de 10	a) 3 b) 2 c) 1 d) 0
¿Fuma usted más cigarros durante la primera parte del día que durante el resto?	a) Sí b) No	a) 1 b) 0
¿Cuánto tiempo transcurre desde que usted despierta hasta que fuma el primer cigarro?	a) Menos de 5 minutos b) 6-30 minutos c) 31-60 minutos d) Más de 60 minutos	a) 3 b) 2 c) 1 d) 0
¿Qué cigarro le es más difícil omitir?	a) El primero de la mañana. b) Algún otro	a) 1 b) 0
¿Le es difícil no fumar donde está prohibido?	a) Sí b) No	a) 1 b) 0
¿Fuma usted cuándo se halla enfermo e incluso en cama?	a) Sí b) No	a) 1 b) 0

La escala para este cuestionario va de 0 a 10 puntos, donde 10 corresponde al mayor grado de adicción.

Conversión: 1 pipa=3 cigarros
1 puro=4-5 cigarros
1 puro pequeño=3 cigarros

Cuestionario tomado del departamento en investigación en tabaquismo y EPOC del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, bajo consentimiento del jefe del departamento.

Suplemento B

Criterios del DSM-IV ⁴⁴

- 1) Tolerancia.
- 2) Síndrome de abstinencia: La abrupta cesación de nicotina o reducción en la cantidad administrada es seguida en las siguientes 24 horas de 4 o más de los siguientes signos:
 - a) Irritabilidad, frustración o enojo.
 - b) Ansiedad.
 - c) Dificultad de concentración.
 - d) Intranquilidad.
 - e) Disminución de la frecuencia cardíaca.
 - f) Incremento del apetito.
 - g) Disforia
 - h) Insomnio
- 3) Evaluación de la frecuencia de consumo de nicotina.
- 4) Deseo compulsivo por consumir la nicotina.
- 5) Necesidad urgente por consumir la nicotina.
- 6) Dejar actividades sociales, ocupacionales o familiares por consumir la nicotina.
- 7) El uso de nicotina continúa, aunque existen problemas de salud.

Suplemento C

Criterios del DSM-5 ⁵¹

- 1) El tabaco es consumido frecuentemente por largos periodos de tiempo
- 2) Intentos fallidos por tratar de dejar el consumo o bien controlar el uso de tabaco.
- 3) Gran cantidad de tiempo invertido en actividades relacionadas a la búsqueda del tabaco.
- 4) *Craving*
- 5) El consumo de tabaco está interfiriendo con actividades escolares, familiares o en el trabajo.
- 6) El uso continuo de tabaco trae consigo problemas sociales o interpersonales.
- 7) Las actividades sociales, ocupacionales o recreativas han ido disminuyendo por el uso del tabaco.
- 8) Uso recurrente del tabaco en situaciones de riesgo.
- 9) Uso persistente del tabaco, aunque el consumidor conozca los problemas físicos y psicológicos ligados a dicho consumo.
- 10) Tolerancia: Necesidad marcada de incrementar la cantidad de tabaco consumido para tener el efecto deseado.
- 11) Síndrome de abstinencia:
 - a) Irritabilidad, frustración o enojo.
 - b) Ansiedad.
 - c) Dificultad de concentración.
 - d) Incremento del apetito.
 - e) Intranquilidad
 - f) Depresión
 - g) Insomnio

Suplemento D

SNP etiqueta incluidos en el microarreglo.

Cr	SNP	BP	MA	FP	FL	NF
15	rs6495307	78890321	T	0.2676	0.2189	0.09375
15	rs12914385	78898723	T	0.3118	0.2415	0.09635
15	rs1317286	78896129	G	0.2941	0.2317	0.09115
15	rs680244	78871288	A	0.2661	0.2454	0.09635
15	rs951266	78878541	T	0.3016	0.2438	0.08594
15	rs17486278	78867482	C	0.3145	0.2454	0.09375
15	rs16969968	78882925	A	0.2608	0.2362	0.08594
15	rs17408276	78881618	C	0.272	0.2081	0.08594
15	rs615470	78885988	T	0.2405	0.2092	0.08854
15	rs950776	78926018	C	0.2433	0.186	0.07292
15	rs11072768	78929478	G	0.4492	0.3838	0.23180
15	rs7179008	32443923	G	0.2914	0.1997	0.08594
15	rs2611605	32441633	T	0.2011	0.1775	0.07552
11	rs2741862	3687985	C	0.2406	0.2149	0.07812
2	rs12995085	50789614	G	0.246	0.1357	0.04167
2	rs985919	50687013	G	0.4439	0.3598	0.19010
2	rs10189159	50714571	C	0.3262	0.2584	0.10940
2	rs1882296	50266845	G	0.3422	0.2439	0.11460
2	rs7604126	50226623	C	0.3575	0.2942	0.15360
2	rs10865246	50670254	C	0.4439	0.3796	0.2500
2	rs11892200	50707858	C	0.3548	0.3006	0.17710
1	rs1127313	154583949	C	0.4697	0.3333	0.09396
1	rs7529003	168600656	T	0.4786	0.4801	0.5104
1	rs6677920	154559842	C	0.1828	0.1143	0.01042
1	rs4845651	154535527	C	0.1979	0.1437	0.03646
1	rs6660775	154538554	G	0.3495	0.3232	0.1979
1	rs1323012	188037933	G	0.4543	0.3918	0.2995
1	rs10489351	241988260	A	0.2781	0.211	0.1510
1	rs1127314	154556266	C	0.2433	0.2027	0.1458
1	rs3811450	154578556	T	0.06793	0.04	0.02083
1	rs11264222	154554357	T	0.2225	0.176	0.1380
1	rs3766927	154564141	A	0.2312	0.1991	0.1458
1	rs924775	242566352	A	0.1528	0.1486	0.08333
1	rs2072658	154540225	A	0.1223	0.1378	0.1016
1	rs2072660	154548721	T	0.2228	0.2385	0.2057
1	rs9427097	154568683	G	0.2326	0.1723	0.2318

2	rs10497811	198902909	C	0.5722	0.4405	0.2682
2	rs1469529	109748621	C	0.3414	0.3226	0.2214
2	rs4971659	50425636	T	0.3798	0.468	0.4948
2	rs6706713	50494373	G	0.7214	0.6277	0
2	rs17512227	50899284	G	0.3992	0.2692	0.06213
2	rs17568791	51021488	C	0.385	0.2569	0.09635
2	rs17040958	50927534	G	0.1946	0.1325	0.01042
2	rs2352540	51131666	C	0.2112	0.1311	0.01823
2	rs918807	50874309	C	0.328	0.2309	0.08333
2	rs17447848	50414171	C	0.1979	0.1296	0.01562
2	rs17041183	51229655	A	0.2033	0.3159	0.487
2	rs858956	50879012	C	0.2059	0.1621	0.02344
2	rs17040501	50604740	T	0.148	0.09627	0.002604
2	rs1014428	50736207	G	0.3289	0.2615	0.1094
2	rs17040026	50384657	C	0.1532	0.1204	0.01042
2	rs2646165	175621482	G	0.3108	0.1871	0.1016
2	rs741351	50755476	G	0.1471	0.1021	0.01042
2	rs10196324	50236619	A	0.5	0.3746	0.2578
2	rs1558852	51252137	A	0.5618	0.5183	0.3229
2	rs17040885	50822050	G	0.2258	0.2058	0.0625
2	rs2600688	175621846	T	0.1593	0.1215	0.02604
2	rs9309192	50937515	T	0.2067	0.1342	0.05208
2	rs17502019	50961916	C	0.09091	0.07339	0
2	rs17495366	50268616	C	0.1952	0.1616	0.05208
2	rs858953	50877042	T	0.1393	0.1037	0.02344
2	rs17040857	50804980	G	0.1337	0.1208	0.02083
2	rs17495345	50267913	C	0.1337	0.09146	0.02083
2	rs17040685	50695100	T	0.09189	0.0679	0.002604
2	rs7568888	50245829	T	0.2027	0.1621	0.0625
2	rs2193870	50179975	A	0.2811	0.2255	0.1198
2	rs858939	50971951	T	0.129	0.07774	0.02344
2	rs10187911	50420809	A	0.1756	0.2572	0.3516
2	rs6726487	50694354	T	0.3676	0.3359	0.1979
2	rs6721498	50713012	A	0.3361	0.2912	0.1719
2	rs17496470	50296740	C	0.139	0.08384	0.03385
2	rs10167695	51058745	C	0.4101	0.3782	0.2328
2	rs12469906	50257479	A	0.2486	0.1672	0.1068
2	rs10182729	50871418	T	0.3877	0.5353	0.5703
2	rs9636391	50201110	A	0.1909	0.144	0.07031
2	rs7593705	50375549	A	0.1946	0.1398	0.07292

2	rs7598402	50735943	G	0.3262	0.2683	0.1719
2	rs1914722	50925528	G	0.371	0.3079	0.2109
2	rs7590358	50682959	T	0.1016	0.06677	0.01823
2	rs13417424	50224256	T	0.1081	0.09722	0.02344
2	rs17476669	50726471	A	0.2337	0.1931	0.1068
2	rs6728741	50575299	T	0.3179	0.267	0.1745
2	rs2081295	50922837	G	0.2177	0.1753	0.09896
2	rs17503170	51015111	A	0.1202	0.08281	0.03385
2	rs6725307	50714013	A	0.162	0.1348	0.0599
2	rs2352077	50801524	T	0.2289	0.4247	0.4255
2	rs544444	50449437	T	0.1432	0.1523	0.04948
2	rs499598	50528952	C	0.3075	0.2119	0.1719
2	rs6743452	50860892	A	0.1859	0.186	0.3307
2	rs1045881	50148972	A	0.1448	0.1006	0.05208
2	rs2351767	50814968	G	0.5134	0.4387	0.3594
2	rs3842981	50976459	A	0.1126	0.08257	0.03385
2	rs9678669	50624071	C	0.3978	0.3384	0.2578
2	rs7599263	50390615	T	0.3811	0.32	0.2448
2	rs13430861	50328375	A	0.3287	0.2892	0.2005
2	rs539260	50423607	A	0.2903	0.26	0.1693
2	rs17560118	50921918	G	0.2513	0.2271	0.138
2	rs2244340	175641575	A	0.5134	0.5	0.3724
2	rs4971686	50604596	A	0.2384	0.273	0.4088
2	rs10490162	51247657	A	0.5249	0.4618	0.3848
2	rs12464203	50530180	T	0.1	0.06966	0.03125
2	rs939398	50419368	T	0.04396	0.05215	0.002604
2	rs1915227	50436177	A	0.5703	0.4558	0.4323
2	rs10208208	50593914	T	0.1332	0.1207	0.05469
2	rs2024513	51152019	G	0.3529	0.3216	0.2318
2	rs896683	50345959	G	0.3824	0.4817	0.5130
2	rs2194385	50865334	A	0.4622	0.4586	0.3333
2	rs1715983	50440176	G	0.3737	0.3095	0.2526
2	rs17501068	50923733	T	0.09375	0.08224	0.03125
2	rs6708544	175604194	A	0.4266	0.4689	0.5524
2	rs1377238	50398902	C	0.3583	0.4634	0.4818
2	rs2060885	50355488	C	0.2059	0.1361	0.1146
2	rs11681792	50184394	T	0.1858	0.1538	0.09896
2	rs10197386	51186984	G	0.4784	0.4512	0.3568
2	rs4662733	128257831	C	0.3182	0.3003	0.2135
2	rs17039997	50147663	C	0.05882	0.03659	0.01562

2	rs7584604	50812891	T	0.4543	0.3945	0.3438
2	rs12713116	50812520	T	0.4409	0.4205	0.3333
2	rs17040809	50537621	A	0.04167	0.04908	0.007812
2	rs7569775	50532337	C	0.3316	0.3838	0.4375
2	rs968972	51171962	A	0.4489	0.4451	0.3464
2	rs9750635	51036712	C	0.2634	0.2287	0.1771
2	rs12464548	50855012	A	0.4005	0.3769	0.3021
2	rs4971675	50660985	A	0.3595	0.3578	0.2656
2	rs991566	50889959	A	0.3946	0.3399	0.2995
2	rs1523355	50328062	A	0.4378	0.3969	0.3411
2	rs9309195	50992027	A	0.129	0.1472	0.07031
2	rs6724128	50442276	T	0.1875	0.146	0.1172
2	rs12622844	50357298	C	0.3904	0.4541	0.487
2	rs6751528	50387243	T	0.4519	0.3654	0.3568
2	rs1520455	50692168	A	0.2977	0.2701	0.212
2	rs719645	50883300	C	0.3027	0.273	0.2188
2	rs9677290	51054002	C	0.3844	0.3506	0.2943
2	rs17572476	51180456	G	0.2567	0.2287	0.1797
2	rs17040241	50442166	T	0.1576	0.1219	0.09635
2	rs7567632	51198384	C	0.2727	0.247	0.1953
2	rs9309197	50993896	A	0.3811	0.3642	0.2969
2	rs1469157	50837494	A	0.4059	0.3731	0.3229
2	rs973364	50375695	G	0.3529	0.2936	0.2734
2	rs10490169	51115619	A	0.1459	0.1193	0.09115
2	rs13017431	51191994	C	0.2246	0.2088	0.1589
2	rs12994492	50627268	C	0.2594	0.2591	0.1901
2	rs1715997	50522118	A	0.2569	0.2181	0.1875
2	rs7562564	226927953	A	0.4457	0.4369	0.3646
2	rs6741326	51129285	A	0.1215	0.1176	0.07292
2	rs1915170	50643419	C	0.3226	0.3659	0.401
2	rs1520526	50514746	T	0.207	0.1481	0.1458
2	rs9752732	50882657	C	0.3476	0.3293	0.2734
2	rs4467312	50826484	C	0.328	0.3272	0.2552
2	rs10490227	50659515	A	0.3387	0.3877	0.4089
2	rs10184594	50968808	C	0.4355	0.4846	0.5052
2	rs9309190	50918967	T	0.3459	0.3338	0.2812
2	rs1469160	50866090	A	0.25	0.2623	0.1927
2	rs858930	50895613	G	0.4005	0.393	0.3385
2	rs4971551	50283485	T	0.3378	0.3129	0.2786
2	rs3213756	50692560	C	0.3877	0.4202	0.4505

2	rs17041095	51127789	A	0.371	0.3994	0.4323
2	rs17040825	50785178	G	0.2514	0.2966	0.3073
2	rs921572	50334088	C	0.3189	0.3231	0.263
2	rs13014442	50994236	G	0.2727	0.2591	0.2214
2	rs10177104	50809998	A	0.3898	0.4618	0.4479
2	rs1517319	169094975	G	0.2634	0.2637	0.2135
2	rs2113404	50938959	C	0.2594	0.2287	0.2109
2	rs13003111	50243386	T	0.3021	0.3519	0.3542
2	rs1544692	51161463	C	0.3984	0.4055	0.4531
2	rs10183541	50716768	G	0.3556	0.346	0.4089
2	rs2678228	50376687	C	0.3503	0.2862	0.2995
2	rs726359	50761787	A	0.3934	0.3851	0.3411
2	rs12713113	50798509	T	0.1114	0.09344	0.1484
2	rs11676290	50690033	T	0.4103	0.4663	0.4635
2	rs13412851	50779296	A	0.3522	0.3994	0.3021
2	rs6756219	50661643	A	0.3668	0.3405	0.3177
2	rs1019318	50741932	G	0.3743	0.3488	0.4219
2	rs13001872	50431752	A	0.228	0.1785	0.1901
2	rs6736816	50255589	C	0.3065	0.3508	0.349
2	rs3850336	51025041	T	0.3478	0.3517	0.388
2	rs7582692	50817203	C	0.3757	0.3933	0.3359
2	rs6753833	50247149	A	0.4758	0.431	0.4349
2	rs6709865	50669861	T	0.3743	0.3536	0.3359
2	rs2048979	50876081	C	0.4679	0.466	0.4297
2	rs4563262	50686373	C	0.3717	0.3957	0.4089
2	rs2018909	50873666	A	0.1398	0.1475	0.1146
2	rs10202039	50970602	G	0.4247	0.4356	0.388
2	rs1104980	50524624	C	0.3449	0.3426	0.3125
2	rs13402450	50489344	A	0.02174	0.04154	0.01302
2	rs9309189	50916673	T	0.484	0.4817	0.4531
2	rs11677389	50702945	A	0.3892	0.4202	0.4193
2	rs11903097	50623839	T	0.3871	0.4358	0.4167
2	rs17040897	50840227	C	0.1156	0.1463	0.1354
2	rs12713120	50876684	C	0.2784	0.2592	0.3021
2	rs10181522	50640323	A	0.2903	0.3092	0.3125
2	rs2351152	50262230	C	0.3877	0.4021	0.3646
2	rs17480512	50874084	C	0.3075	0.3338	0.2865
2	rs1217436	50562960	C	0.4758	0.4817	0.4531
2	rs10175903	50774094	T	0.3892	0.3862	0.3672
2	rs17040256	50450187	A	0.1731	0.1975	0.1901

2	rs11897191	50443908	A	0.2174	0.2778	0.2344
2	rs1005431	50682462	A	0.3361	0.327	0.3177
2	rs2351765	50793781	A	0.3387	0.3872	0.3568
2	rs17439140	50195048	T	0.4484	0.4338	0.4297
2	rs4971552	50075840	G	0.3642	0.4185	0.3464
2	rs17040976	50946373	G	0.3118	0.3049	0.2969
2	rs11125280	50197075	T	0.4351	0.4451	0.4193
2	rs1520439	50650102	A	0.3405	0.3225	0.3255
2	rs939425	50540740	C	0.5053	0.4741	0.4896
2	rs1402128	50617013	G	0.377	0.346	0.362
2	rs1469159	50837708	T	0.4439	0.4497	0.4583
2	rs17501747	50947044	C	0.2166	0.2393	0.2057
2	rs10495987	50153280	C	0.4385	0.4375	0.4505
2	rs6545163	50551568	G	0.4651	0.4586	0.4531
2	rs1402124	50605553	T	0.3235	0.3491	0.3125
2	rs11125306	50669962	C	0.3378	0.3277	0.3307
2	rs9752126	50920698	T	0.3656	0.4146	0.3594
2	rs1915236	50509697	A	0.4839	0.4923	0.4792
2	rs3908115	51040802	G	0.3316	0.3262	0.3281
2	rs10203511	50540027	G	0.4118	0.4329	0.4089
2	rs1520528	50223647	T	0.03825	0.04784	0.03906
2	rs17504439	51073449	T	0.1401	0.1547	0.1406
2	rs2216784	50829144	C	0.2888	0.2691	0.2891
2	rs2600685	175627048	G	0.1613	0.1555	0.1615
2	rs1403654	50171574	A	0.1449	0.1757	0
4	rs4861085	40373082	A	0.212	0.1677	0.0625
4	rs10021263	40342618	G	0.2005	0.1509	0.08333
4	rs16852105	40374286	G	0.1845	0.1391	0.08073
4	rs6818783	40323397	C	0.2946	0.2637	0.1693
4	rs17440690	40387873	A	0.1946	0.1765	0.1094
4	rs10805157	40371612	C	0.2527	0.2729	0.3438
4	rs13123893	40393828	A	0.3649	0.42	0.4609
4	rs278977	40392496	T	0.1885	0.176	0.125
4	rs11731787	40396697	C	0.2742	0.3003	0.3516
4	rs10008749	40365550	C	0.4812	0.4131	0.4036
4	rs278973	40396560	A	0.3984	0.4049	0.3255
4	rs991529	151495331	T	0.4305	0.439	0.3568
4	rs10009228	40356422	A	0.3459	0.362	0.4115
4	rs1826394	40383379	G	0.4412	0.3933	0.3854
4	rs6819385	40339574	A	0.3804	0.4363	0.4323

4	rs4476635	40395896	A	0.09615	0.1111	0.25
4	rs10029313	40350147	T	0.4341	0.4193	0.4688
4	rs4447895	40397253	A	0.1033	0.1417	0.08333
4	rs10021851	40368848	G	0.5134	0.4756	0.487
4	rs10518234	81152247	T	0.3342	0.3596	0.349
8	rs7815985	32199222	A	0.4358	0.3884	0.2344
8	rs4735224	91567046	C	0.4382	0.372	0.2604
8	rs2198044	111173806	G	0.5	0.4832	0.4557
8	rs7012713	42737160	T	0.04331	0.05819	0.4127
8	rs9314347	27319805	G	0.2032	0.1372	0.01823
8	rs1868859	42515801	T	0.116	0.09538	0.03906
8	rs16891620	42625663	A	0.1436	0.1028	0.05729
8	rs11785591	42507740	G	0.123	0.1387	0.05208
8	rs4458859	42518768	T	0.0847	0.09877	0.03125
8	rs10109429	42618390	T	0.1984	0.2738	0.2943
8	rs4953	42732516	C	0.0508	0.04421	0.01823
8	rs7825128	42659048	G	0.2701	0.2988	0.3281
8	rs13280604	42559586	G	0.2312	0.2683	0.2708
8	rs7004381	42551161	A	0.3027	0.3503	0.2682
8	rs6474414	42560336	A	0.2377	0.295	0.2708
8	rs2741339	27334969	C	0.3342	0.3262	0.3047
8	rs2163177	27323860	T	0.2312	0.2645	0.2214
8	rs2565059	27336978	T	0.2622	0.2731	0.2526
8	rs4950	42552633	C	0.262	0.2722	0.2708
11	rs10500607	4671821	A	0.2772	0.3006	0.3646
11	rs1390783	91883206	G	0.3838	0.3067	0.1979
11	rs2672215	3691649	A	0.2886	0.2358	0.1589
11	rs2231532	3693120	A	0.224	0.2183	0.1432
11	rs726601	121481407	C	0.4759	0.4404	0.375
11	rs10501330	50149040	C	0.4358	0.3547	0.3411
11	rs10502034	104309414	A	0.4514	0.3865	0.3828
11	rs2672213	3691417	T	0.2115	0.2099	0.1901
15	rs4625676	67660134	C	0.3503	0.3171	0.151
15	rs8041377	78694463	G	0.5778	0.2566	0.01562
15	rs16969920	78803723	G	0.1952	0.1052	0.002604
15	rs16969931	78824448	C	0.1872	0.125	0
15	rs7165657	78861351	G	0.1872	0.09146	0.002604
15	rs7177514	78907406	C	0.4839	0.3746	0.1875
15	rs667282	78863472	T	0.4572	0.3684	0.1823
15	rs1481131	78976478	C	0.1845	0.1159	0.01042

15	rs6495309	78915245	C	0.516	0.407	0.2318
15	rs1504545	78818471	C	0.361	0.2702	0.112
15	rs17487514	78953785	T	0.3081	0.2269	0.07812
15	rs637137	78873976	T	0.4516	0.3853	0.1823
15	rs8034191	78806023	C	0.3128	0.247	0.08854
15	rs905739	78845110	T	0.4324	0.3484	0.1745
15	rs938682	78896547	T	0.4486	0.3785	0.1875
15	rs3743078	78894759	C	0.4301	0.3716	0.1771
15	rs3885951	78825917	C	0.1925	0.1707	0.02865
15	rs11071515	32349507	G	0.2366	0.1982	0.07812
15	rs684513	78858400	C	0.5892	0.4969	0.3776
15	rs1878397	78987239	T	0.09831	0.09317	0.005208
15	rs4887077	78978364	T	0.2834	0.2338	0.1198
15	rs12905641	78964362	T	0.2222	0.1761	0.07812
15	rs1500948	32399723	C	0.328	0.2622	0.1589
15	rs8023462	78914734	C	0.2366	0.1948	0.09115
15	rs11638372	78983559	T	0.2742	0.2217	0.1198
15	rs17487223	78923987	T	0.3	0.2586	0.1432
15	rs1948	78917399	T	0.228	0.1934	0.09115
15	rs1979905	78842374	T	0.2555	0.22	0.112
15	rs8038654	32284864	T	0.1541	0.1199	0.04427
15	rs12901682	78833223	A	0.08242	0.06019	0.007812
15	rs660652	78887832	A	0.2097	0.1908	0.08594
15	rs621849	78872861	G	0.2112	0.1743	0.09115
15	rs3813567	78934551	C	0.4091	0.5274	0.5677
15	rs8032156	78964498	G	0.5403	0.446	0.3828
15	rs6494212	32385119	T	0.2639	0.2384	0.1536
15	rs8043123	78973393	C	0.5108	0.4207	0.3776
15	rs35057608	32403531	A	0.1685	0.1553	0.08073
15	rs3971872	78942035	T	0.09341	0.06481	0.03646
15	rs3825806	78985342	C	0.3529	0.3578	0.4635
15	rs2063722	32296373	C	0.3189	0.3018	0.224
15	rs12900519	78949127	C	0.2567	0.2064	0.1719
15	rs10438342	32402046	A	0.2622	0.2485	0.1771
15	rs8038920	78974545	A	0.3316	0.292	0.2422
15	rs12443170	78615394	A	0.1607	0.1886	0.08594
15	rs2337233	32307215	T	0.371	0.367	0.2917
15	rs904951	32418038	A	0.4892	0.5137	0.4062
15	rs904952	32418745	C	0.4866	0.5091	0.4036
15	rs1392808	32411515	T	0.1291	0.1173	0.08073

15	rs11071503	32334956	T	0.4282	0.4601	0.4974
15	rs2337980	32444196	T	0.3548	0.3853	0.2943
15	rs1355920	32357728	G	0.254	0.221	0.2083
15	rs11072793	79006442	G	0.4545	0.468	0.5078
15	rs1514260	32298950	A	0.4679	0.4618	0.5078
15	rs1913456	32345949	T	0.3838	0.3948	0.349
15	rs1909884	32439298	T	0.3763	0.3716	0.4036
15	rs6494223	32396457	T	0.422	0.4892	0.4427
15	rs2869550	78981001	C	0.4548	0.4228	0.4453
15	rs2133965	32384554	T	0.1868	0.1985	0.1875
17	rs17806566	7352163	C	0.1872	0.1208	0.007812
17	rs2302763	7455958	C	0.4898	0.332	0.2266
17	rs17732878	7362359	C	0.1973	0.157	0.08594
17	rs2302762	7358861	C	0.5349	0.4787	0.4167
17	rs2302764	7360110	C	0.4274	0.4558	0.5339
17	rs9217	7363088	G	0.3898	0.37	0.3281
17	rs2302765	7350975	G	0.2312	0.2134	0.2083
20	rs6056500	9240838	C	0.3743	0.404	0.4609
20	rs6090378	61975378	G	0.293	0.1863	0.02865
20	rs6011734	61954952	G	0.1622	0.1344	0.007812
20	rs735501	62000202	G	0.246	0.1988	0.08594
20	rs2038442	62028210	G	0.4439	0.4617	0.2474
20	rs3787138	61979224	G	0.2594	0.2561	0.1094
20	rs2236196	61977556	G	0.2086	0.2117	0.1198
20	rs4603829	61968892	T	0.5428	0.4924	0.4297
20	rs2273502	61987822	T	0.09497	0.1111	0.04167
20	rs4809552	62028308	T	0.2022	0.2277	0.2396
20	rs6090392	62008975	G	0.4891	0.5177	0.4557
20	rs6122434	62014997	A	0.4113	0.3841	0.4245
20	rs755203	61994264	C	0.4274	0.4893	0.4219
20	rs6011805	62018747	A	0.388	0.4235	0.3906

Cr, Cromosoma. BP, pares de bases, MA, Alelo menor, FP, Fumador pesado, FL, Fumador ligero. NF, No fumador.

Suplemento E

Marcadores informativos de ancestría incluidos en el microarreglo

Cr	SNP	BP	MA	FP	FL	NF
1	rs6604679	222052546	A	0.4194	0.3762	0.25
1	rs1442460	221287380	T	0.3614	0.3077	0.2031
1	rs10489280	172472620	A	0.4332	0.3635	0.2786
1	rs2478518	230867870	G	0.3978	0.4694	0.5521
1	rs3917406	169702278	C	0.4167	0.4648	0.4948
1	rs4651379	187386073	A	0.4167	0.469	0.4818
3	rs1316579	174300176	G	0.4032	0.3003	0.1927
3	rs7627711	189773017	T	0.2231	0.2324	0.1068
3	rs6783980	88399097	T	0.3142	0.2717	0.1797
3	rs2350488	139784874	T	0.2957	0.267	0.2005
3	rs1462845	117224163	A	0.4643	0.4213	0
3	rs1495060	164378586	T	0.3081	0.3123	0.3828
4	rs10488924	58150308	T	0.3279	0.2729	0.1615
4	rs2614559	179376852	T	0.3763	0.318	0.224
4	rs189988	16770235	A	0.2811	0.362	0.4349
5	rs4077816	95582494	C	0.4465	0.4405	0.5208
5	rs9325002	145426248	C	0.4044	0.4388	0.4557
6	rs1431807	115388972	C	0.2888	0.247	0.1198
6	rs6921590	148437640	G	0.4266	0.4052	0.2969
6	rs10484689	147925750	T	0.2989	0.2601	0.1927
6	rs6930662	155551221	A	0.4022	0.439	0.5208
6	rs10484353	15692027	G	0.2647	0.2104	0.1953
6	rs9321726	139866922	C	0.3957	0.439	0.4557
6	rs2095019	169564874	A	0.3602	0.4022	0.3698
7	rs16077	24353507	C	0.4113	0.5077	0.5443
7	rs10487547	143720987	G	0.3871	0.2936	0.263
7	rs7458608	34534966	G	0.4543	0.4756	0.474
7	rs997381	107046471	G	0.4212	0.399	0.4382
9	rs1551411	2631932	C	0.5027	0.4756	0.3776
9	rs10521063	105981176	T	0.2568	0.2748	0.2812
10	rs7088182	8460891	T	0.3556	0.2654	0.1562
10	rs1777744	111525371	C	0.1703	0.1858	0.09635
10	rs1707284	17013667	G	0.3656	0.3517	0.388
12	rs2706301	60135402	G	0.4649	0.4268	0.3281
12	rs1183253	26090884	G	0.4706	0.3826	0.349
13	rs7329539	94052090	C	0.4251	0.5168	0.5391
13	rs10508058	101861912	T	0.3957	0.4345	0.474

Suplemento F

Ensayo de genotipificación mediante *GoldenGate*.

Antes de comenzar con la genotipificación, guardar los mapas de distribución (*Bead map*) para cada microarreglo según el código de barras asignado por la empresa en la computadora del equipo donde se realizará la lectura del microarreglo.

Preparación de las muestras

Descongelar a temperatura ambiente las muestras de DNA y homogeneizar en vórtex.

Hacer el diseño para que en una placa de 96 pozos se puedan colocar las muestras a genotipificar.

Normalizar las muestras de DNA a 50 ng/ μ L con amortiguador Tris-EDTA (TE) en la placa de 96 pozos.

Colocar 5 μ L de cada una de las muestras de DNA en otra placa de 96 pozos que denominaremos placa SUD

Pre-Amplificación

Precalear el bloque térmico a 95°C.

Encender el sellador térmico.

Descongelar a temperatura ambiente el reactivo MS1, agitar en vórtex y depositar su contenido en un reservorio de plástico nuevo.

Agregar a cada pozo de la placa SUD con una pipeta multicanal, 5 μ L de reactivo MS1.

Colocar una cubierta de aluminio a la placa y sellar en el sellador térmico por 3 segundos.

Centrifugar un pulso a 250 g la placa SUD.

Agitar en vórtex a 2300 rpm por 20 segundos.

Centrifugar un pulso a 250 xg.

Colocar la placa SUD en el bloque térmico e incubar a 95°C por 30 min.

Una vez terminada la incubación colocar inmediatamente un bloque pesado por 3 minutos para evitar que se deforme la placa.

Centrifugar a 3000 g 2 minutos.

Precalentar el bloque térmico a 70°C.

Preparar el robot para ser usado en el modo “*SUD/Precip SUD*” e indicarle el número de placas a trabajar.

Mantener a temperatura ambiente la placa SUD y descongelar el tubo PS1

Colocar un reservorio pequeño en la posición A del tablero del robot, de acuerdo con el mapa del monitor de la PC y dispensar PS1 como sigue:

- 2 mL para 1 placa.
- 2.5 mL para 2 placas.
- 3 mL para 3 placas

Colocar un reservorio mediano en la posición B indicada por el monitor de acuerdo con la posición del tablero del robot. Dispensar 2-propanol como se indica:

- 9 mL para una placa
- 17 mL para 2 placas
- 25 mL para 3 placas

Colocar la placa SUD en el robot de acuerdo a la posición indicada por el monitor.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Cuando el robot finalice, sellar cada placa SUD con una cubierta adhesiva.

Agitar la placa a 1600 rpm por 20 segundos o hasta que los pozos se observen completamente azules.

Centrifugar la placa SUD a 3000 g por 20 min. Al finalizar deben ser visibles los botones azules en la parte inferior de cada uno de los pozos.

Si no sucede este fenómeno, centrifugar nuevamente la placa a 3000 g por 10 minutos más.

Remover la cubierta plástica y decantar el sobrenadante por inversión. Se debe de retirar el exceso de sobrenadante golpeando suavemente la placa invertida sobre un papel absorbente.

Colocar la placa boca arriba por 1 hora a temperatura ambiente, para permitir la evaporación del resto de sobrenadante y secar los botones precipitados de DNA.

Una vez terminado el tiempo de evaporación seleccionar desde la PC del robot, el modo “*Select SUD/Resuspend SUD*”.

Escribir en la computadora el número correcto de placas.

Colocar un reservorio pequeño en la posición A que indica el robot y dispensar RS1 como sigue:

- 3.5 mL para 1 placa
- 6 mL para 2 placas
- 8.5 mL para 3 placas

Colocar la placa SUD en el tablero del robot de acuerdo al mapa del monitor para este procedimiento.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Cuando el robot termine, sellar cada placa con una cubierta adhesiva translúcida.

Agitar en vórtex la placa a 2300 rpm por 20 segundos o hasta que los pozos se observen uniformes en coloración azul.

Centrifugar la placa a 280 xg por 1 min.

Precalentar el bloque térmico a 70°C.

Descongelar los tubos de OPA y OB1 a temperatura ambiente y homogeneizar en vórtex.

Tomar una nueva placa e identificarla como ASE

Preparar el robot para su uso seleccionando el modo “*SUD/Make SUD ASE*” e indicar el número de placas.

Centrifugar los tubos de OPA y OB1 a 280 g un pulso.

Colocar los tubos de OPA y OB1 en la distribución que marca el monitor.

Centrifugar la placa SUD a 280 g por 1 min.

Colocar las placas SUD y ASE en el tablero del robot de acuerdo a la posición indicada en el monitor de la PC.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Cuando termine el robot, colocar una cubierta de aluminio a la placa ASE y sellar térmicamente por 3 segundos.

Agitar la placa ASE en vórtex a 1600 rpm por 1 min.

Colocar cada placa ASE en el bloque térmico previamente precalentado a 70°C y cerrar.

Cambiar la temperatura del bloque térmico a 30°C e incubar la placa ASE por 2 horas.

Una vez terminada la incubación precalentar el bloque térmico a 45°C y dejar que se equilibre.

Descongelar los reactivos MEL, AM1 Y UB1 a temperatura ambiente. Invertir 10 veces los tubos para mezclar su contenido.

Preparar el robot para su uso seleccionando “*Biochem/Add MEL*” e indicar el número de placas a trabajar.

Colocar el tubo MEL en la gradilla del robot de acuerdo a la distribución.

Colocar un reservorio pequeño en la posición A del robot y dispensar AM1 de la siguiente manera:

- 15 mL para 1 placa.
- 30 mL para 2 placas
- 45 mL para 3 placas.

Colocar un reservorio mediano en la posición B del robot y dispensar UB1 como sigue:

- 15 mL para 1 placa ASE
- 30 mL para 2 placas ASE
- 45 mL para 3 placas ASE

Centrifugar cada una de las placas ASE por 1 min a 280 g.

Colocar la placa ASE en la barra magnética del robot de acuerdo al mapa de distribución de la pantalla.

Esperar a que todas las perlas sean capturadas por el imán, el cual tarda cerca de 2 min. Retirar la cubierta de la placa.

Iniciar el robot presionando run y escribir la contraseña.

Retirar la placa ASE del tablero y sellar con una cubierta adhesiva.

Agitar en vórtex la placa ASE a 1600 rpm por 1 min.

Regresar la placa ASE a la posición indicada por el robot, retirar la cubierta plástica y presionar OK

Remover la placa ASE y sella con una cubierta adhesiva.

Agitar en vórtex a 1600 rpm por 1 min, hasta que todas las perlas se encuentren completamente resuspendidas.

Regresar la placa a su posición correcta de acuerdo al tablero, retirar la cubierta adhesiva y presionar OK

Cuando finalice el robot, retirar la placa ASE

Sellar la placa con una cubierta adhesiva transparente.

Agitar la placa en vórtex a 1725 rpm por 1 min.

En el robot presionar OK.

Colocar la placa ASE en el bloque térmico precalentado a 45°C, cerrar la tapa e incubar por exactamente 15 min.

Descongelar el tubo del reactivo MMP a temperatura ambiente y mezclar por inversión.

Preparar el robot para su uso.

Colocar el código de barras que indique PCR a cada placa nueva.

Desde la PC del robot, seleccionar "*Biochem/Make PCR*" e indicar el número de placas.

Agregar 64 μ L de DNA polimerasa a cada tubo de MMP.

Agregar 50 μ L de Uracil DNA Glucosilasa a cada tubo de MMP.

Tapar el tupo de MMP y mezclar por inversión 10 veces.

Colocar cada tubo MMP en la gradilla del robot de acuerdo a la pantalla correspondiente

Colocar una nueva placa e identificarla como PCR en el robot de acuerdo a la distribución indicada en la pantalla de la PC.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Sellar la placa con una cubierta adhesiva translúcida.

Precalentar el bloque térmico a 95°C.

Descongelar el tubo de IP1 a temperatura ambiente y mezclar en vórtex.

Seleccionar desde la PC del robot "*Biochem/Inoc PCR*" e indicar el número de placas con las que se está trabajando

Invertir 10 veces el tubo IP1 y centrifugar a 280 xg.

Colocar el tubo en la gradilla del robot de acuerdo a la distribución indicada.

Colocar un reservorio chico en la posición A del tablero del robot y dispensar el reactivo UB1 de la siguiente manera:

- Para 1 placa 10 mL
- Para 2 placas 15 mL
- Para 3 placas 20 mL

Colocar cada la placa ASE en el robot de acuerdo a la distribución indicada.

Colocar la placa de PCR en el robot de en su posición indicada en la PC.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Remover la placa ASE y sellarla con una cubierta adhesiva transparente.

Agitar en vórtex a 1900 rpm por 1 min.

Incubar por 1 minuto la placa en el bloque térmico a 95°C.

Regresar la placa a su posición original, remover la cubierta plástica y seleccionar OK en la PC del robot para continuar con el proceso.

El robot esperará 1 min a que las perlas se fijen completamente y entonces incorporará el contenido desnaturalizado de la placa ASE a placa de PCR.

Remover la placa ASE y de PCR del robot. Desechar la placa ASE y sellar la placa PCR con una cubierta especial, pasarla al termociclador.

Amplificación

Una vez colocada la placa de PCR en el termociclador usar el siguiente programa para la amplificación.

Programa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	37°C	10 min	1
2	95°C	3 min	1
	95°C	35 segundos	
3	56°C	35 segundos	34
	72°C	2 min	
4	72°C	10 min	1
5	4°C	5 min	1

La placa se puede quedar durante toda la noche en el termociclador.

Post-Amplificación

Descongelar el reactivo MPB a temperatura ambiente.

Colocar a temperatura ambiente y proteger de la luz cada placa de PCR por 15 min.

Seleccionar en el robot el modo “*Post-PCR Task/Bind PCR*”, indicar el número de placas.

Agitar en vórtex el tubo MPB por 30 segundos hasta que se resuspendan las perlas.

Colocar el tubo MPB en el robot de acuerdo a la distribución de pantalla.

Dispensar 5 mL de 2-butanol por cada placa PCR a procesar en un reservorio pequeño en la posición A.

Centrifugar la placa PCR a 3000 g por 30 segundos.

Colocar la placa PCR en el robot de acuerdo a la distribución indicada en la PC.

Posteriormente retirar la cubierta plástica.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Sellar con una cubierta adhesiva la placa de PCR.

Incubar la placa de PCR en un lugar seguro y proteger de la luz por 1 hora a temperatura ambiente.

Programar el horno de hibridación a 60°C.

A una placa nueva de 96 pozos se le denominará INT mientras que a otra placa de 384 pozos se le denominará HYB.

Seleccionar desde la PC del robot, "*Post-PCR Task/Make Hyb*" e indicar el número de placas.

Centrifugar un pulso a 280 g, el tubo del reactivo MH1.

Colocar el tubo MH1 de acuerdo a la distribución del robot.

Colocar un reservorio pequeño en la posición B del robot y agregar 10 mL de NaOH 0.1 N por placa de hibridación.

Colocar un reservorio pequeño en la posición A del robot con 10 mL del reactivo UB2 por placa de hibridación.

Colocar las placas PCR, INT e HYB de acuerdo a la distribución del robot. Remover la cubierta plástica de la placa de PCR.

Iniciar el robot presionando en run y escribir la contraseña.

Remover la placa HYB y sellar con una cubierta adhesiva translúcida. Proteger la placa de la luz.

Centrifugar la placa HYB a 3000 g por 4 min para remover las burbujas.

Hibridar al microarreglo.

Dejar a temperatura ambiente los microarreglos 10 minutos antes de iniciar el proceso de hibridación, no retirar el empaque, mantenerlo en la mesa de trabajo por no más de 24 h.

Preparación de las guías de alineación para puntas del robot:

Lavar y secar las guías alineadoras de puntas del robot previo a su uso.

Asegurarse de tener la guía alineadora correcta de puntas para el ensayo GoldenGate. El código de barras de la guía debe decir “*Guide-C*”.

Ensamblado de cámaras de hibridación:

Colocar todos los suplementos en la mesa de trabajo:

- Cámara de hibridación (1 por cada 3 microarreglos).
- Empaque de cámara de hibridación (1 por cada cámara).
- Insertos metálicos de microarreglos para la cámara de hibridación (1 por microarreglo).

Colocar el empaque a la cámara de hibridación.

Agregar 200µL de reactivo CHB en cada uno de los 8 pozos de cada cámara de hibridación a usar.

Cubrir la cámara de hibridación con su respectiva tapa.

Mantener cerrada la cámara de hibridación a temperatura ambiente hasta el momento de la incorporación de la muestra de DNA al microarreglo y de la incubación.

Remover los microarreglos de su empaque.

Para los microarreglos de 12 muestras colocar sobre cada alineador a utilizar 2 microarreglos con el código de barras apuntando hacia la parte inferior con las ranuras del alineador.

En la PC del robot seleccionar el modo “*Task/Hyb Universal BC*” señalando las placas con las que se está trabajando.

Elegir el microarreglo apropiado en la pantalla de diálogo.

Asegurarse que los códigos de barras sean claros. En el panel de "*Basic Run Parameters*", elegir el número de placas de hibridación a procesar.

Colocar el alineador de los microarreglos en el robot de acuerdo al mapa de distribución de la pantalla. Colocar cada alineador con la parte superior izquierda en la posición marcada en el robot.

Si se están usando los microarreglos de 32 muestras, asegurar que la flecha plateada este apuntando hacia la parte superior izquierda cuando sea coloque el alineador en el robot.

Iniciar el robot presionando run y escribir la contraseña.

Presionar OK para confirmar que han sido colocados correctamente los alineadores, microarreglos y la placa de muestras.

El robot transferirá las muestras de las placas a los microarreglos.

Al finalizar el proceso, remover cuidadosamente cada guía alineadora de puntas del robot. Posteriormente remover el alineador de los microarreglos del robot y asegurarse que todas las líneas de los microarreglos se encuentren cubiertas de DNA, Recordar que algunas secciones del microarreglo pueden no estar cubiertas en su totalidad.

Nota: Al finalizar la hibridación deben ser lavados y secar inmediatamente los alineadores de las puntas.

Desechar la placa de hibridación una vez transferidas las muestras.

En una cámara de hibridación colocar los insertos en ésta y colocar los microarreglos con el código de barras orientado hacia las ranuras de los insertos.

Cerrar adecuadamente la cámara de hibridación.

Colocar la cámara sellada con los microarreglos en el horno de hibridación a 60°C.

Incubar por 30 min exactamente a 60°C y cambiar a 45°C, dejar incubando mínimo 16 horas y máximo 18 horas.

Agregar 335 mL de etanol absoluto grado biología molecular a la botella de XC4. El volumen final será de 350 mL.

Cerrar la botella y agitar vigorosamente por 15 segundos.

Dejar la botella sobre la mesa en posición horizontal con la etiqueta mirando arriba toda la noche.

Antes de finalizar el tiempo de incubación mezclar nuevamente la botella de XC4 con etanol hasta asegurarse de disolver completamente el polímero.

Encender 2 h antes el escáner "*Bead Array Reader*".

Llenar 2 vasos de lavado con 300 mL de buffer PB1 y un vaso de lavado con XC4.

Sumergir las gradillas para microarreglos en uno de los 2 vasos de lavado de PB1, de tal manera que, posteriormente, puedan removerse fácilmente los microarreglos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, retirar del horno de hibridación las cámaras de hibridación que contienen los microarreglos.

Remover los microarreglos uno por uno y cámara por cámara.

Retirar la cubierta plástica con precaución de cada microarreglo en forma diagonal de manera consistente.

Colocarlos en la gradilla del vaso de lavado con PB1.

Cargar la gradilla con máximo 12 microarreglos. Colocar 6 en la primera parte y 6 en la segunda. Tratando de dejar un espacio entre cada laminilla.

Una vez que todos los microarreglos se encuentren dentro del vaso de lavado con PB1, mover de arriba a abajo 10 veces lentamente, para romper la tensión superficial.

Transferir la gradilla al segundo vaso de lavado con PB1 y dejar reposar por 5 minutos.

Transferir la gradilla al vaso con XC4 y mover de arriba a abajo lentamente 10 veces. Dejar reposar por 5 min.

Preparar una gradilla para tubos de ensaye, colocarla sobre papel absorbente para evitar el escurrimiento del remanente de XC4 dentro de un desecador conectado al vacío.

Remover la gradilla con los microarreglos con un movimiento rápido y directo de tal manera que quede la gradilla con los microarreglos mirando hacia arriba.

Retirar cada microarreglo de la gradilla con las pinzas y colocar hacia arriba sobre la gradilla del desecador.

Activar la cámara de vacío con al menos una presión de 508 mm de Mercurio.

Secar por 55 min.

Limpiar la parte posterior del microarreglo con un papel absorbente que no desprenda partículas y humedecida con etanol al 70% para remover el exceso de XC4.

Colocar los microarreglos sobre la base de lectura.

Abrir el programa en la computadora del escáner, el programa "*BeadScan*".

Seleccionar "*Scan*".

Señalar el tipo de microarreglo que se está usando.

Poner la dirección de la fuente de datos en el "*Data repository*" y en "*Decode Data*".

Cada archivo tiene que haber sido copiado en un folder específico; el archivo es "*decode map*" (*.dmap) para cada microarreglo.

Seleccionar el "*Scan setting*" para microarreglos de 32 muestras: "*Universal X (GGGT)*" y seleccionar "*Scan*"

Una vez finalizada la lectura, juntar los datos y generar los archivos .ped y .map.

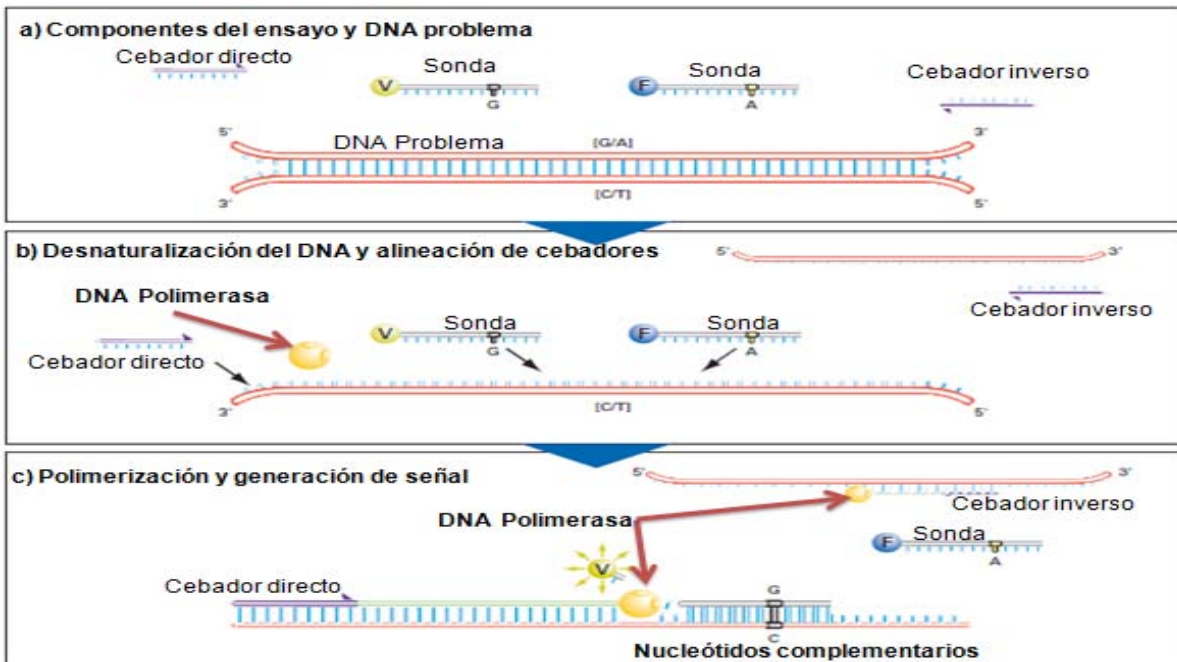
Suplemento G

Discriminación alélica por PCR en tiempo real.

Con esta técnica se mide la fluorescencia emitida por las sondas marcadas con fluoróforos específicos (Figura E). El ensayo está constituido por:

- DNA de interés a amplificar.
- Dinucleótidos trifosfatados (dNTPs), iones bivalentes Mg^{2+} y DNA polimerasa.
- Cebadores específicos (para la hebra adelantada y para la retrasada) para hacer un mayor número de copias de la región que contiene el polimorfismo de interés.
- Dos sondas *Taqman* (*Applied Biosystems*): Una sonda marcada con el fluoróforo VIC el cual detecta la secuencia con el alelo 1 y la otra marcada con el fluoróforo FAM el cual detecta la presencia del alelo 2.

Figura E. Fundamento de la técnica de PCR en tiempo real empleando sondas Taqman, modificado de Applied Biosystems.



La técnica de PCR en tiempo real tiene el siguiente principio, en la figura Ea se observa la cadena de DNA problema, los cebadores para la hebra adelantada y para la hebra retrasada

y las sondas marcadas con VIC y FAM las cuales detectan los alelos 1 y 2 respectivamente, estos se pueden identificar en la información que proporciona el proveedor. La desnaturalización del DNA y alineación de los cebadores se lleva a cabo mediante el aumento de la temperatura a 95°C, se separan las 2 hebras, posteriormente se alinean los cebadores y las sondas específicas dependiendo de la muestra analizada en ambas cadenas (figura Eb) para dar paso a la polimerización (figura Ec), la DNA polimerasa comienza a sintetizar las cadenas complementarias, en este mismo punto ocurre la generación de las señales al unirse las sondas marcadas con los fluoróforos a la cadena de DNA en el momento en el que detectan la secuencia específica para la cual fueron diseñadas y emiten la fluorescencia correspondiente.