



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**VARIANTES GENÉTICAS, EXPRESIÓN GÉNICA, METILACIÓN Y BÚSQUEDA
DE BLANCOS TERAPEUTICOS EN VÍAS DE RESPUESTA INFLAMATORIA
EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN UNIVERSITARIA COLOMBIANA CON
PROBLEMAS DE CONSUMO DE ALCOHOL.**

MAURICIO REY BUITRAGO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2022

VARIANTES GENÉTICAS, EXPRESIÓN GÉNICA, METILACIÓN Y BÚSQUEDA DE BLANCOS TERAPEUTICOS EN VÍAS DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN UNIVERSITARIA COLOMBIANA CON PROBLEMAS DE CONSUMO DE ALCOHOL

MAURICIO REY BUITRAGO

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

Ph.D. Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez

Líneas de Investigación:

Biotecnología en salud y

Genética de las adicciones

Grupos de Investigación:

Farmacogenética del cáncer y

Genética clínica

(a)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2022

Dedicatoria

A mis padres, familiares y amigos quienes con su amor, paciencia y colaboración me apoyaron y han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí con ejemplo la perseverancia y persistencia, indispensables características de cualquier científico.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre: Mauricio Rey Buitrago

Fecha 30/octubre/ 2022

Agradecimientos

A todos aquellos voluntarios que con sus muestras biológicas y participación diligenciando formatos y cuestionarios hicieron posible este trabajo.

A los docentes de la Universidad Nacional de Colombia, que confiaron en mí, especialmente al Profesor Fabio Aristizábal, director de este trabajo.

A los estudiantes de semilleros, maestrantes y jóvenes investigadores que colaboraron enormemente con sacar adelante los proyectos asociados a este tema apasionante del estudio genético del alcoholismo en Colombia, en especial a Tania Martínez por el apoyo con el trabajo con los voluntarios y pacientes. Su apoyo logístico fue fundamental.

A la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación parcial del proyecto.

A Rita Baldrich y Blanca Schoroeder por su colaboración en la secuenciación y electroforesis capilar. A Diego Fernando Rincón y Jhanpierre Ocampo por la estandarización de algunos marcadores tipo SNV's/STR. Son muchísimas más las personas que facilitaron la utilización de un equipo, la obtención de algún reactivo o material; eternamente agradecido con todos ellos, son tantos, imposible nombrarlos uno a uno.

Resumen

VARIANTES GENÉTICAS, EXPRESIÓN GÉNICA, METILACIÓN Y BÚSQUEDA DE BLANCOS TERAPEUTICOS EN VÍAS DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN UNIVERSITARIA COLOMBIANA CON PROBLEMAS DE CONSUMO DE ALCOHOL.

Introducción

La dependencia al alcohol y fenotipos relacionados poseen patrones de herencia del tipo multifactorial. El componente genético es muy variable étnicamente hablando y muy dependiente de la evolución personal de la enfermedad. Aunque se han identificado múltiples loci, las variantes funcionales no se han identificado en la mayoría de los casos. En este trabajo seleccionamos genes candidatos de la vía de respuesta inflamatoria y determinamos variantes genéticas en la región promotora, su estado de metilación y expresión en forma de ARNm y proteína comparando controles y casos con uso problemático del alcohol de una población universitaria de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia. Con estos datos proponemos candidatos a diana terapéutica, los cuales se caracterizaron.

Métodos

Para la selección de la muestra se realizó una convocatoria dentro de la sede de la Universidad y se aplicaron estrictos criterios de inclusión y exclusión. Se realizaron extracciones de ADN y ARN total. Empleamos la PCR convencional seguida de secuencia de Sanger para la determinación de polimorfismos e identificar las variantes génicas asociadas con el uso problemático del alcohol.

Con el empleo de diversas herramientas bioinformáticas se realizó el estudio de haplotipos, desequilibrio de ligamiento y epistasis. La expresión diferencial de ARNm se determinó por RT-q-PCR mientras la proteica por ELISA. El estado de metilación se evaluó indirectamente por modificación del ADN por la técnica del bisulfito seguida PCR, marcaje fluorescente y electroforesis capilar. La obtención y caracterización de los candidatos a blanco terapéutico se realizó por modelado por homología y docking molecular, además del empleo de numerosas herramientas bioinformáticas adicionales.

Resultados

En el presente estudio se obtuvo la información genética de un marcador STR, de 28 variantes de nucleótido simple (SNV) en once genes relacionados con respuesta inflamatoria, reportando por primera vez sus frecuencias alélicas y genotípicas para población colombiana. Además de encontrar haplotipos asociados a la protección contra la enfermedad e interacciones génicas con efectos acumulativos que se asocian con el fenotipo bebedor. De esta primera parte del estudio se perfilaron como candidatos a seguir con el estudio, los genes SNCA, TNFR1, INFGR1 y MIF. Seguidamente se determinaron los niveles de proteínas y ARNm evidenciando una expresión diferencial hacia la baja en forma de ARNm para los genes TNFR1 y MIF y proteica para MIF, mientras se detecta expresión diferencial de las proteínas SNCA, IL6R1 y MIF dependiendo del sexo de los participantes, en hombres hacia la baja. Nuestros datos indican que hay cambios del estado de metilación en el promotor de los genes MIF en los casos de la muestra general y en SNCA de los casos de sexo masculino que conllevarían a disminución en la síntesis de mRNA y proteína. Se seleccionaron las proteínas MIF y SNCA como blancos terapéuticos y se generó modelos que se caracterizaron y así proporcionar una base útil para proponer vías para mejorar la terapia dirigida contra esta patología.

Conclusión

Los haplotipos en los genes SNCA, TNFR1 e INFGR1 identificados son variantes funcionales que pueden afectar la susceptibilidad al consumo de riesgo de alcohol

y fenotipos relacionados. Además, que su interacción parece ser fundamental para el establecimiento de estos fenotipos. Nuestro estudio proporciona información sobre la expresión y regulación de estos genes de respuesta inflamatoria en estos fenotipos de consumo problemático de alcohol y se propone dos proteínas candidatas como blanco terapéutico.

Polimorfismo Genético, alcoholismo, Expresión Génica, metilación, blanco terapéutico

Palabras clave: Polimorfismo Genético, alcoholismo, Expresión Génica, metilación, blanco terapéutico

Abstract

GENETIC VARIANTS, GENE EXPRESSION, METHYLATION AND THE SEARCH FOR THERAPEUTIC TARGETS IN INFLAMMATORY RESPONSE PATHWAYS IN A SAMPLE OF A COLOMBIAN UNIVERSITY POPULATION WITH ALCOHOL CONSUMPTION PROBLEMS

Introduction

Alcohol dependence and related phenotypes have multifactorial inheritance patterns. The genetic component is very variable ethnically speaking and highly dependent on the personal evolution of the disease. Although multiple loci have been identified, functional variants have not been identified in most cases. In this work, we select candidate genes of the inflammatory response pathway and determine genetic variants in the promoter region, their methylation status and expression in the form of mRNA and protein, comparing controls and cases with problematic alcohol use in a university population from the Bogotá campus. from the National University of Colombia. With these data we propose candidates for therapeutic targets, which were characterized.

Methods

For the selection of the sample, a call was made within the University headquarters and strict inclusion and exclusion criteria were applied. DNA and total RNA extractions were performed. We used conventional PCR followed by Sanger sequencing to determine polymorphisms and identify gene variants associated with problematic alcohol use. With the use of various bioinformatic tools, the study of haplotypes, linkage disequilibrium and epistasis was carried

out. The differential expression of mRNA was determined by RT-q-PCR while protein expression was determined by ELISA. Methylation status was indirectly assessed by DNA modification by the bisulfite technique followed by PCR, fluorescent labeling, and capillary electrophoresis. The obtaining and characterization of the therapeutic target candidates was carried out by homology modeling and molecular docking, in addition to the use of numerous additional bioinformatic tools.

Results

In the present study, the genetic information of a STR marker of 28 single nucleotide variants (SNV) in eleven genes related to inflammatory response was obtained, reporting for the first time its allelic and genotypic frequencies for the Colombian population. In addition to finding haplotypes associated with protection against disease and gene interactions with cumulative effects that are associated with the drinking phenotype. From this first part of the study, the SNCA, TNFR1, INFGR1 and MIF genes were outlined as candidates to continue with the study. Next, protein and mRNA levels were determined, showing a downward differential expression in the form of mRNA for the TNFR1 and MIF genes and protein for MIF, while differential expression of the SNCA, IL6R1 and MIF proteins was detected depending on the sex of the participants. , in men downwards. Our data indicate that there are changes in the methylation state in the promoter of the MIF genes in the cases of the general sample and in the SNCA of the male cases that would lead to a decrease in the synthesis of mRNA and protein. The MIF and SNCA proteins were selected as therapeutic targets and models were generated that were characterized and thus provide a useful basis for proposing ways to improve targeted therapy against this pathology.

Conclusion

The haplotypes in the SNCA, TNFR1, and INFGR1 genes identified are functional variants that may affect susceptibility to hazardous drinking and related phenotypes. Furthermore, their interaction seems to be fundamental for the establishment of these phenotypes. Our study provides information on the expression and regulation of these inflammatory response genes in these

phenotypes of problematic alcohol consumption and two candidate proteins are proposed as therapeutic targets.

Keywords: Genetic Polymorphism, alcoholism, Gene Expression, Methylation, therapeutic target.

Contenido

Introducción	¡Error! Marcador no definido.
Métodos	¡Error! Marcador no definido.
Resultados.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	8
1 Capítulo 1. Marco teórico.....	11
1.1 GENERALIDADES.....	11
1.2 GENES INVOLUCRADOS EN LA PATOLOGIA.....	13
1.3 EXPRESIÓN GÉNICA EN EL ALCOHOLISMO.....	22
1.4 ASPECTOS EPIGENETICOS DEL ALCOHOLISMO	24
1.5 TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL ALCOHOLISMO	28
OPRM1 (receptor opioide μ) posición 118 A >G.....	31
Mayor afinidad por naltrexona. Cambio en la posición 40 de Asn/Asp, Pacientes con G responden mejor al tratamiento con naltrexona, menor número de recaídas (66).....	31
DRD2, TaqIA, polimorfismo A1	31
ANKK1, TaqIA.....	31
Menor disponibilidad de receptores cerebrales de dopamina. En homocigotos para A1 es más eficaz el acamprosato. Mientras, que en homocigotos para A2 es más eficaz la naltrexona. Homocigotos para A1 tratados con bromocriptina presentan menos “ansiedad”(18,21).....	31
DRD4, VNTR.....	31
Se encontró que un VNTR de DRD4 Exon III interactúa con bupropión para influir en la posible abstinencia. Poseedores de >7 repeticiones presentan recaídas más fácilmente (77).	31
SLC6A4, ins/del 44 pb en promotor, Alelos L y S	31
Mejor respuesta al tratamiento con ondansetrón y sertralina en los homocigotos para L (76).....	31
GRABA2 A por G (ra279858).....	31
Homocigotos para A responden mejor a la psicoterapia (26,27,92).	31
GABRG3.....	31
Receptor de GABA, bajas concentraciones de alcohol alteran su expresión. Blanco terapéutico para bumetanida (26,92).	31
EAAT1 y 2	31

Blanco de bloqueadores de transportadores de glutamato. Algunas variantes están asociadas con alcoholismo (93,94).	31
NPY leu7pro	31
Polimorfismo asociado a alcoholismo en poblaciones nórdicas (95)	31
GRABA6, T1519C	31
Portadores de C responden mejor al acamprosato	31
Portadores de T responder mejor a la naltrexona (81,96,97)	31
GRIK1	31
Relación con efectos adversos por Topiramato (86)	31
1.6 ALCOHOLISMO E INFLAMACION	32
1.1.1 ALFA SINUCLEÍNA	36
1.1.2 INTERLEUQUINA 6 Y SUS RECEPTORES	39
1.1.3 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) Y SUS RECEPTORES	40
1.1.4 INTERLEUQUINA 1 Y SUS RECEPTORES	42
1.1.5 INTERLEUQUINA 12 Y SUS RECEPTORES	43
1.1.6 INTERFERONES Y SUS RECEPTORES	44
1.1.7 INOS	45
1.1.8 MIF (FACTOR INHIBIDOR DE MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS) Y SUS RECEPTORES	46
1.1.9 NFkB	48
1.1.10 HMGB1	49
1.7 Hipótesis	51
1.8 OBJETIVO GENERAL	51
1.9 OBJETIVOS ESPECIFICOS	52
2 Capítulo 2	53
2.1 Objetivo 1:.....	53
2.1.1 Introducción:.....	53
2.1.2 Metodología:	54
2.2 RESULTADOS	64
2.2.1 FRECUENCIAS GENOTIPICAS Y ALELICAS DE SNV'S EN LA REGION PROMOTORA DE LOS GENES SELECCIONADOS.....	68
2.2.2 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS.....	78
2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
3 Capítulo 3	95
3.1 OBJETIVO 2:	95
3.2 INTRODUCCIÓN:.....	95
3.3 METODOLOGÍA:	96
3.3.1 ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA	96
3.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	97
3.3.3 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)	98
3.3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA-qPCR.....	99
3.3.5 ENSAYO DE ELISA	103

3.4	RESULTADOS:.....	105
3.4.1	ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ARNm.....	105
3.4.2	ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	113
3.5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	117
4	Capítulo 4.....	123
4.1	Objetivo 3:.....	123
4.2	Introducción:.....	123
4.3	METODOLOGÍA.....	124
4.3.1	ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACION.....	124
4.3.2	Protocolo para metilación de productos de PCR purificados y empleados como ADN totalmente metilado de referencia.....	127
4.4	RESULTADOS.....	129
4.5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	138
5	Capítulo 5.....	144
5.1	Objetivo 4:.....	144
5.2	Introducción:.....	144
5.3	Metodología:.....	145
5.3.1	ESTUDIO BIOINFORMÁTICO.....	145
5.4	Resultados:.....	147
5.4.1	En UNIPROT se buscó las secuencias de las proteínas de interés:.....	147
5.4.2	Generación de modelos.....	149
5.4.3	Validación de los modelos bio-informáticamente.....	149
5.5	Discusión de resultados:.....	162
6	Conclusiones y recomendaciones.....	168
6.1	Conclusiones.....	168
7	ANEXOS.....	173
7.1	Anexo 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	173
	<i>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.....</i>	<i>173</i>
7.2	ANEXO 2: Encuesta AUDIT.....	175
7.3	Anexo 3 GUIÓN DE LA ENTREVISTA SOBRE CONSUMO DE ALCOHOL.....	177
	<i>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.....</i>	<i>177</i>
7.4	Anexo 4. Tabla S-1 Frecuencias alélicas mundiales y las reportadas en este trabajo.....	179
7.5	Anexo 5: Tabla S-2. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO (n=139, 73 controles y 66 casos).....	181
7.6	Anexo 6: Tabla S-3. Frecuencias genotípicas en controles e individuos con uso problemático del alcohol.....	183

Publicaciones relacionadas y participación en eventos académicos

SciMedCentral Journal of Substance Abuse & Alcoholism

Research Article

Determination of Genetic Polymorphism Taq1a (Ank11) Taq1b (Drd2), -141c Ins/Del (Drd2) And 40 Bp Vntr (Slc6a3) in the Colombian Population and Evaluation of their Associations with Alcoholism

Tatiana Ximena Castro Matiz¹, Fabio Ancizar Ariztizabal Gutierrez² and Mauricio Rey Buitrago^{3*}

¹Department of Medicine, National University of Colombia, Colombia
²Department of Pharmacy, National University of Colombia, Colombia

*Corresponding author
Mauricio Rey Buitrago, Department of Medicine, National University of Colombia, Entrance Calle 53, building 426, Institute of Genetics, Bogotá, Colombia. Tel: 571-3163000; E-mail: mreymb@unal.edu.co

Submitted: 06 July 2015
Accepted: 28 September 2015
Published: 30 September 2015

Copyright © 2015 Buitrago et al.

OPEN ACCESS

Keywords
• Alcohol Dependence
• Polymorphism
• Dopamine
• ANK11
• DRD2

Abstract

Biomedica 2015;40:309-21
doi:10.1007/s00770-015-0471-1

Artículo original

Expresión de alfa sinucleína en sangre y su relación con el estreñimiento crónico en población residente en Bogotá, D.C., con problemas de consumo de alcohol

Tania Yulira Martínez-Rodríguez¹, Mauricio Rey-Buitrago²

¹Maestría en Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
²Maestría en Genética Humana, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El consumo excesivo de alcohol resulta en neuroadaptación, neurodegeneración y expresión diferencial de numerosos genes. **Objetivo.** Determinar la relación entre la expresión del gen de la alfa sinucleína (SNCA) en sangre, las variantes de nucleótido único (Single Nucleotide Variant, SNV) en su región promotora y el estreñimiento crónico en personas con problemas de consumo de alcohol. **Materiales y métodos.** La muestra estuvo conformada por 30 controles y 27 casos, seleccionados según el puntaje obtenido con la herramienta AUDIT. En el diagnóstico del estreñimiento se aplicaron los criterios de Roma IV. La extracción de ácidos nucleicos se hizo a partir de sangre periférica y se evaluó la expresión del gen mediante qPCR, la cuantificación precisa por ELISA y la presencia de SNV en la región promotora del gen por la secuenciación de Sangre.

Resultados. Se observó sobreexpresión génica relativa de AHNm del gen SNCA en el grupo de casos sin relación con el estreñimiento crónico. Se evidenció un riesgo 4.6 veces mayor de presentar estreñimiento en el grupo de casos. Se anotaron nuevos variantes de nucleótido simple en un segmento de la región promotora del gen rica en secuencias reguladoras CpG, con frecuencia similar entre los grupos, y se detectó una variante en la posición -2171 que no se encuentra reportada en GenBank para variantes clónicas y cuyo genotipo A/T se relacionó con el incremento de la expresión del AHNm del SNCA.

Conclusión. En personas con problemas de consumo de alcohol se evidenció la sobreexpresión del AHNm de alfa sinucleína, lo cual no se relacionó con el diagnóstico de estreñimiento crónico.

Palabras clave: alcoholismo; estreñimiento; alfa-sinucleína; expresión génica; polimorfismo genético; inflamación.

Recibido: 15/11/2018
Aceptado: 12/05/2019
Publicado: 13/05/2019

Citación:
Martínez-Rodríguez TY, Buitrago MR, Fernández

México C/et al/Colombia Médica - Vol. 46 N°4 2015 (Oct-Dic)



Colombia Médica
colombiamedica.univalle.edu.co

Original Article

Characterization of polymorphisms of genes ADH2, ADH3, ALDH2 and CYP2E1 and relationship to the alcoholism in a Colombian population

Caracterización de polimorfismos de los genes ADH2, ADH3, ALDH2 y CYP2E1 y su relación con el alcoholismo en una población colombiana

Claudia Méndez, Mauricio Rey

Clinical Genetic Group, Facultad de Medicina, Instituto de Genética, Maestría en genética Humana, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Méndez C. Rey M. Characterization of polymorphisms of genes ADH2, ADH3, ALDH2 and CYP2E1 and relationship to the alcoholism in a Colombian population. *Colomb Med (Bogotá)* 2015; 46(4):178-82.

© 2015. Universidad del Valle. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Article history

Abstract

Resumen

Received: 24 July 2014 Objective: Identify and characterize polymorphisms of genes ADH2, ADH3, ALDH2 and CYP2E1 in a Colombian population residing ADH2, ADH3, ALDH2 and CYP2E1 of colombians residents in the
14 October 2015 ADH2, ALDH2 and CYP2E1 in a Colombian population residing ADH2, ADH3, ALDH2 and CYP2E1 of colombians residents in the
14 October 2015

Efectos del etanol en la expresión génica de a-sinucleína en células cancerígenas.

Breyner Joel Quiñones Castro

Mauricio Rey Buitrago
Universidad Antonio Nariño

Palabras clave: A-sinucleína. Alcoholismo. Expresión diferencial

RESUMEN

El uso crónico del alcohol se ha relacionado con cambios importantes en la expresión de a-sinucleína, alterando el sistema de recompensa y generando daño neuronal y mitocondrial. Existen muy pocos tratamientos para esta enfermedad y los resultados son modestos, por lo que su estudio es necesario para el desarrollo de nuevas terapias. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de bajas dosis del etanol en células cancerígenas con diferentes esquemas de dosificación y determinar la tasa de expresión del gen de a-sinucleína. Se muestra que existe una disminución en la expresión de a-sinucleína en los tratamientos con etanol.



PDF

PUBLICADO

2020-03-20

COMO CITAR

Rev. Fac. Med. 2019 Vol. 47 No. 3: 303-10

303

REVIEW ARTICLE

DOI: <http://dx.doi.org/10.15448/rfm.v47n3.40962>

Physiological, molecular and genetic aspects of alpha-synuclein and its correlation with high alcohol consumption

Aspectos fisiológicos, moleculares y genéticos de la a-sinucleína y su relación con el alto consumo de alcohol

Received: 25/01/2018 Accepted: 11/06/2018

Tania Yulira Martínez-Rodríguez¹ • Mauricio Rey-Buitrago²

¹Universidad Nacional de Colombia - Bogotá Campus - Faculty of Medicine - Department of Physiological Sciences - Master's Program in Physiology - Bogotá D.C. - Colombia
²Universidad Nacional de Colombia - Bogotá Campus - Faculty of Medicine - Department of Morphology - Master's Program in Human Genetics - Bogotá D.C. - Colombia

Corresponding author: Mauricio Rey-Buitrago, Maestría en Genética Humana, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-01, edificio 436, laboratorio 3, Phone number: +57 1 3165000, ext. 11610 Bogotá D.C. Colombia. Email: mreymb@unal.edu.co

Abstract

Resumen

Introducción: Significant changes in the expression of a-synuclein (SNCA) can be seen in subjects with high alcohol consumption, altering neuroprotection and causing changes in the reward system.

Introducción: En sujetos con alto consumo de alcohol se han observado cambios importantes en la expresión de a-sinucleína (SNCA) que altera la neuroprotección y ocasiona cambios en el sistema de recompensa.

Objective: To present state-of-the-art studies on the physiological, molecular and genetic aspects of SNCA related to high alcohol consumption.

Objetivo: Describir el estado del arte de los aspectos fisiológicos, moleculares y genéticos de SNCA relacionados con el alto consumo de alcohol.

Material and methods: A search of records published from 2007 to 2017 in PubMed, ScienceDirect and Cochran was carried out using the following terms: alpha-synuclein, alcoholism, genetic polymorphisms.

Materiales y métodos: Se realizó una búsqueda de registros publicados entre 2007 y 2017 en las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Cochran con los términos alfa-sinucleína, alcoholismo, polimorfismo genético.

Lista de figuras

Figura 2-1 Gráfico circular basado en entropía de interacciones gen-gen en población de individuos con uso problemático del alcohol ajustado por sexo (a), edad (b) y edad de inicio de consumo(c).	92
Figura 2-2 Dendograma de interacciones de genes seleccionados con mayor porcentaje de interacción en población con uso problemático del alcohol	92
Figura 2-3 Red genética funcional para las proteínas SNCA, IFNGR1, MIF e iNOS2.....	94
Figura 3-1 Expresión relativa de ARNm de SNCA (A), IL6R1 (B), TNFR1(C) y MIF(D) en células mononucleares de sangre periférica en controles y casos alcohol-dependientes (gen calibrador: GADPH). Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea transversal que representa la mediana.	108
Figura 3-2 Curva de temperatura de fusión para amplificadores obtenidos en el termociclador LigthCycler 96 para las muestras de sujetos control del estudio para los genes: SNCA (a), TNFR1(b), IL6R1(c), MIF (d) y GADPH(e).....	110
Figura 3-3 Logaritmo en base 10 de la tasa de transcripción relativa de los genes seleccionados: SCNA (azul), MIF (verde), TNFR1 (beige) y IL6R1 (púrpura) comparando casos y controles.....	111
Figura 3-4 Diagrama de dispersión entre las variables de tasa de transcripción de los genes TNFR1 y MIF en controles y individuos con uso problemático del alcohol.....	112
Figura 3-5 Concentración de proteínas (pg/mL) de SNCA (A), IL6R1 (B), TNFR1(C) y MIF(D) en plasma sanguíneo de controles y casos (alcohol-dependientes). Los datos se presentan como un diagrama de cajas que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana. ..	115
Figura 4-1 Electroferogramas de amplificadores de genes seleccionados: SNCA (A), INFR1 (B) y MIF (C) que muestra el estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG; el primer pico de cada figura corresponde a ADN control totalmente metilado mientras el segundo corresponde al mismo segmento sin metilar.	133
Figura 4-2 Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A), INFR1 (B) y MIF(C) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (alcohol-dependientes). Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.	134

Figura 4-3 Electroferogramas de secuencia de amplificadores de ADN modificados con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A, B), INFR1 (C, D) y MIF (E, F) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (alcohol-dependientes).	137
Figura 4-4 Tamaño de amplificadores de ADN modificados con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes MIF(A) y MIF(B) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (alcohol-dependientes) estratificados por sexo. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana	141
Figura 5-1 Resultado del alineamiento de la secuencia de interés MIF con las secuencias depositadas en PDB.....	148
Figura 5-2 Resultados de los gráficos de Ramachandran para el Modelo 1 (A) y el Modelo 2(B) de la proteína MIF y SNCA	151
Figura 5-3 Resultados de los Valores Z calculados con Web ProSa para los modelos 1, 2 de MIF y SNCA.....	152
Figura 5-4 Compatibilidad modelo 3D-1D para el modelo 1 de MIF.....	153
Figura 5-5 Compatibilidad modelo 3D-1D para el modelo 1 (a) y modelo 2 (b) de MIF.	
Figura 5-6 Estructuras secundarias para la secuencia de la proteína seleccionada MIF y SNCA	155
Figura 5-7 Modelo 1 (a), modelo 2(b) de MIF obtenidos por el servidor swiis model y modelo de SNCA descargada de PDB y visualizadas con Pymol.	
Figura 5-8 Detección de cavidades, posibles sitios de unión de ligandos para el modelo 1(a), modelo 2(b) de MIF y modelo de SNCA.....	156

Lista de tablas

Tabla 1-1 Hallazgos moleculares relacionados con el alcoholismo empleando las nuevas tecnologías de genética molecular.	20
Tabla 1-2 Fármacos que se emplean en el tratamiento del alcoholismo y sus principales efectos y/o recomendaciones de uso.	30
Tabla 1-3 Principales polimorfismos de proteínas involucradas en señalización o metabolismo del alcohol, dianas farmacéuticas actuales.	31
Tabla 2-1 Dominios y Contenidos del AUDIT. (Tomado de: Monteiro M. Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas)(8).	56
Tabla 2-2 Montaje de la mezcla de PCR convencional para la amplificación de segmentos de ADN que contenían las variantes seleccionadas de SNV's.	59
Tabla 2-3 Características de los primer's empleados para la PCR convencional en la determinación de variantes genéticas (SNV's y STR's) seleccionadas.	61
Tabla 2-4 Características sociodemográficas de los participantes en el estudio ..	65
Tabla 2-5 Listado de genes, variantes genéticas estudiadas, frecuencia alélica mínima(MAF) y equilibrio de Hardy Weinberg tanto para controles como alcohol-dependientes.	69
Tabla 2-6 Frecuencia de genotipos y alelos de diferentes SNV's de la región promotora de los genes candidatos seleccionados.	70
Tabla 2-7 Frecuencias genotípicas en individuos con uso problemático del alcohol y controles y su riesgo de susceptibilidad (modelo codominante).	74
Tabla 2-8 Frecuencias genotípicas y alélicas del STR Rep-1 del gen SNCA	76
Tabla 2-9 Asociación entre SNV's y el riesgo de susceptibilidad a alcohol-dependencia con sus modelos de herencia y sus odds ratios de genotipos e intervalos de confianza.	76
Tabla 2-10 Análisis de interacción de genotipos con covariable sexo mediante regresión logística	77
Tabla 2-11 Frecuencias de haplotipos de marcadores y asociación con riesgo de susceptibilidad a alcohol-dependencia en casos y controles. Ajustados por sexo, edad y edad de inicio del consumo.	79
Tabla 2-12 Resultados con diferencias estadísticamente significativas en el análisis de interacción de haplotipos con covariable sexo mediante regresión logística. Ajustados por sexo, edad y edad de inicio del consumo.	80

Tabla 2-13 Estadísticos de análisis de múltiples SNV's: desequilibrio de ligamiento y haplotipos.	80
Tabla 2-14 Características del modelo de interacciones gen-gen, gen-medio ambiente asociado con susceptibilidad a la alcohol-dependencia, ajustado por sexo, edad y edad de inicio de consumo.	90
Tabla 3-1 Componentes de la solución máster mix para la realización de la transcripción.	98
Tabla 3-2 Características de los primer's diseñados para realizar la qPCR y determinar la tasa de expresión de los ARNm de los genes seleccionados.	101
Tabla 3-3 Composición de la mezcla para qPCR preparada con el kit Luna ® Universal qPCR Master Mix.	102
Tabla 3-4 Comparación de medias de la tasa de transcripción de ARNm de los genes SNCA, IL6R1, TNFR1 y MIF en células mononucleares de sangre periférica de controles y casos alcohol-dependientes.	106
Tabla 3-5 Matriz de correlación entre las tasas de expresión relativa del ARNm de los genes de interés (SCNA, IL6R1, TNFR1 y MIF) en las muestras de los grupos control y alcohol-dependientes (AD).	112
Tabla 3-6 Comparación de medias de la concentración de proteína de SNCA, IL6R1, TNFR1 y MIF en plasma sanguíneo de controles y casos alcohol-dependientes.	114
Tabla 3-7 Matriz de correlación entre la concentración de proteína producto de la expresión de los genes de interés en las muestras de los grupos control y alcohol-dependientes (AD).	117
Tabla 4-1 Características de los primer's empleados en la amplificación de segmentos del promotor ricos en secuencias CpG de los genes seleccionados.	125
Tabla 4-2 Comparación de medias del tamaño de amplificados de segmentos del promotor ricos en islas CpG de ADN modificado con bisulfito y corridos en electroforesis capilar de los genes SNCA, INFG1 y MIF en controles y casos alcohol-dependientes.	131
Tabla 4-3 Tamaños de grupo de segmentos génicos amplificados experimentalmente y predichos de ADN metilado y no metilado corridos en electroforesis capilar.	133
Tabla 5-1 Resultado de los parametros de los gráficos de Ramachandran para los modelos obtenidos (1 y 2) de la proteína MIF.	151
Tabla 5-2 Parámetros de las cavidades detectadas para el modelo 1 de MIF.	158
Tabla 5-3 Ligandos de MIF, representación 3D de la interacción del sitio de unión de MIF y diversos ligandos.	159

Lista de Símbolos y abreviaturas**A**

<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ADH</i>	Alcohol deshidrogenasa
<i>ALDH</i>	Aldehído deshidrogenasa
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>ARNm</i>	Ácido ribonucleico mensajero
<i>AUDIT</i>	Test de identificación de desórdenes en el consumo de alcohol
<i>ATV</i>	Área tegmental ventral

B

<i>BDNF</i>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<i>BLAST2</i>	Herramienta básica de alineación de secuencias

C

<i>cADN</i>	ADN complementario
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
CO_2	Dióxido de Carbono
<i>COMT</i>	Catecol-O-metiltransferasa
<i>Cq/Ct</i>	Ciclo de cuantificación
<i>CREB</i>	Elemento de respuesta a cAMP
<i>CTR</i>	Control
<i>CYP2E1c2</i>	Citocromo P4502E1

D

<i>DAT1</i>	Transportador de dopamina tipo 1
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>DNMT's</i>	DNA metiltransferasas
<i>DOPA</i>	Dihidrofenilalanina
<i>DNMT-1</i>	DNA (Cytosine-5) Methyltransferase-1

<i>DRD2</i>	Receptor de dopamina tipo D2
<i>DTT</i>	Ditiotreitol
E	
<i>EDTA</i>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<i>ELISA</i>	Enzyme-linked immunosorbent assay: Ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas
<i>ERK</i>	Extracellular signal-regulated kinases
F	
<i>FASTA</i>	Formato basado en texto que representa la secuencia de ácidos nucleicos
G	
<i>GABA</i> ,	ácido gamma aminobutírico
<i>GADPH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
<i>GM-CSF</i>	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
H	
<i>H₂O₂</i>	Peróxido de Hidrógeno
<i>HCl</i>	Ácido clorhídrico
<i>HPLC</i>	High Performance Liquid Chromatography
<i>HDAC</i>	Histona deacetilasa
<i>HDM</i>	Histona demetilasa
<i>HMT</i>	Histona metiltransferasa
<i>HTA</i>	Histona acetiltransferasa
<i>5-HT</i>	5-hidroxitriptamina, serotonina
<i>5-HTT</i>	Transportador de serotonina tipo 5
I	
<i>IFNα</i>	Interferón alfa
<i>IFNγ</i>	Interferón Gamma

<i>Iκ-B</i>	Inhibidor del factor nuclear κB
<i>IL</i>	Interleukin
<i>IL1-R1</i>	Interleukin 1 Receptor Type 1
<i>IL1-R2</i>	Interleukin 1 Receptor Type 2
<i>IL-1β</i>	Interleukin 1 beta
<i>IL-6</i>	Interlequina 6
<i>IL-6R1</i>	Receptor de interlequina 6 tipo 1

K

<i>KCl</i>	Cloruro de Potasio
<i>Kg</i>	Kilogramo

L

<i>LDH</i>	Lactato Deshidrogenasa
<i>LPS</i>	Lipopolisacárido

M

<i>M</i>	Molar (concentración)
<i>mg</i>	Miligramo
<i>MCP</i>	proteína quimotáctica de monocitos
<i>MEF</i>	myocyte Enhancer Factor
<i>MIF</i>	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
<i>mL</i>	Mililitro
<i>μL</i>	Microlitros
<i>mM</i>	Milimolar
<i>μM</i>	Micromolar
<i>MMP</i>	Metaloproteinasas de Matriz
<i>mRNA</i>	Messenger RNA

N

<i>N</i>	Normal (Concentración)
----------	------------------------

<i>NAC</i>	Núcleo accumbens
<i>NaCl</i>	Cloruro de Sodio
<i>NaOH</i>	Hidróxido de sodio
<i>NF-κB</i>	Nuclear Factor Kappa B
<i>ng</i>	Nanogramo
<i>NK</i>	Natural Killer
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>NOS2</i>	Óxido nítrico sintasa inducible
<i>nt</i>	Nucleótido
O	
O_2^-	Anión superóxido
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OPRM1</i>	Receptor opioide μ
P	
<i>PAF</i>	Factor activador de plaquetas
<i>pb</i>	Pares de Bases
<i>PBS</i>	Tampón fosfato salino
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PGE2</i>	Prostaglandina E2
<i>PKA</i>	Proteinquinasa A
<i>PPAR</i>	Peroxisome proliferator-activated receptors
Q	
<i>qPCR</i>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R	
<i>RANKL</i>	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>RNA</i>	Ribonucleic Acid

ROS Reactive Oxygen Species

rpm Revoluciones por Minuto

S

SAM S-adenosilmetionina

SFB Suero Fetal Bovino

SNV's Variante de nucleótido simple

STAT3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STR Short tandem repeat- microsatélite

T

TAE Tris Ácido Acético y EDTA

TAM Tumor-Associated Macrophages

TBE Tris ácido bórico y EDTA

TGF Transforming Growth Factor

TIR Toll/Interleukin-1 Receptor

TLR Toll-Like Receptor

TLR4 Toll-Like Receptor Type 4

TNFR1 Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNF- α Tumoral Necrosis Factor alfa

U

UTR Región no traducida del gen

V

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VNTR Variable Number Tandem Repeat

INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es una enfermedad psiquiátrica compleja, crónica, progresiva y mortal, de herencia multifactorial que se ha convertido en las últimas décadas (50 años) en uno de los problemas de salud pública de mayor magnitud con relación a psicoactivos de uso legal, siendo una problemática de alcance mundial, nacional y regional que pone en peligro tanto el desarrollo individual, la vida familiar y la convivencia social de una persona. Se ha relacionado con más de 200 enfermedades como el cáncer, accidentes cerebrovasculares, cirrosis hepática, enfermedades psiquiátricas etc. con el consumo problemático de alcohol y alcoholismo. En el informe anual más reciente de la OMS (Organización Mundial de la Salud), al alcoholismo se le atribuyeron 2,8 millones de muertes en todo el mundo, lo que corresponde al 2,2% del total de muertes estandarizadas por edad entre las mujeres y al 6,8% entre los hombres (1,2). Al igual que en resto del mundo, el alcohol es la sustancia psicoactiva legal más consumida en Colombia, cerca de siete millones de personas con edades entre 12 y 65 años son consumidores de alcohol, lo que equivale a 35% de la población en ese rango etario. De éstos, alrededor de 2,4 millones de personas presentan un consumo de riesgo o perjudicial lo que representa el 35% del total de consumidores y 12,5% de la población total entre 12 y 65 años(3).

No existen metodologías experimentales de diagnóstico, los tratamientos farmacológicos son deficientes. Al ser una enfermedad multifactorial, con un componente genético poligénico (aproximadamente del 50 %), este aspecto puede ser una forma de acercamiento alternativa hacia la enfermedad. A nivel mundial los resultados de este tipo de estudios genéticos han sido contradictorios y muy dependientes de aspectos étnicos. Tradicionalmente, los estudios de

asociación de genes y la alcohol-dependencia se han centrado en estudios de variantes de nucleótido simple (SNV's) de manera aislada con pocos genes, lo que se traduce en difíciles asociaciones a lo que se le suma su variabilidad interétnica. Por otro lado, en las dos últimas décadas, además de los estudios de genómica total, transcriptómica, metilómica etc. se ha ampliado el conocimiento sobre vías particulares como la producción y efecto de las citoquinas proinflamatorias y la producción de ROS en el alcoholismo y sus efectos en diversos órganos como huesos, músculos, corazón, pulmón, cerebro etc. Al verse el alcoholismo como una condición inflamatoria abre la posibilidad de utilizar nuevos agentes terapéuticos o agentes empleados en el tratamiento de otras patologías relacionadas con inflamación, para tratar algunos de los efectos perjudiciales de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar algunos aspectos genéticos y epigenéticos asociados con el consumo problemático de alcohol en una muestra de población universitaria colombiana, particularmente nos centramos en algunos genes de respuesta inflamatoria. Además de proponer posibles dianas terapéuticas mediante la determinación de variantes genéticas, el estudio de la expresión y metilación de esos genes candidatos asociados al riesgo (susceptibilidad) y/o a la protección hacia el consumo problemático de alcohol.

En Colombia ya se han adelantado algunos trabajos de genética molecular del alcoholismo con un número reducido de genes y polimorfismos, realizados por nuestro grupo (4–6). En el presente trabajo se incluyeron 11 genes candidatos relacionados con el proceso de respuesta inflamatoria, además de 28 SNV's se analizó una variante de longitud (STR), la expresión génica tanto en forma de ARNm como proteica y el estado de metilación de regiones promotoras de algunos de ellos, es decir se tuvo un acercamiento más funcional para mejorar la comprensión de la patología. Además, se seleccionó algunos de ellos y se postularon como posibles dianas terapéuticas. El trabajo es una contribución en el campo de la genética y farmacogenética del problema de consumo de alcohol en población colombiana al proponer un acercamiento actualizado y prometedor al problema, como son los genes candidatos de una vía asociada recientemente y

relacionada con una respuesta funcional al consumo de alcohol. A mediano y largo plazo los resultados de este trabajo contribuirán a realizar propuestas investigativas concretas para tener un mejor acercamiento en el conocimiento del papel de la genética en el consumo problemático de alcohol en población colombiana, que podrían tener repercusiones tanto en la prevención (consejería genética), en el diagnóstico (susceptibilidad) y tratamiento (farmacogenética). El presente trabajo se desarrolló con el apoyo de los grupos de genética clínica de la facultad de medicina y farmacogenética del cáncer de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y por supuesto al interés de las personas del grupo control y con problemas de consumo de alcohol que voluntariamente participaron en el estudio.

1 Capítulo 1. Marco teórico

1.1 GENERALIDADES

Inicialmente abordaremos una serie de conceptos básicos relacionados con el consumo de sustancias psicoactivas, haciendo énfasis particularmente en el alcohol. La OMS define al **alcoholismo o alcohol dependencia** (términos que utilizaremos como sinónimos en este documento) como el consumo crónico y continuado o al consumo periódico de alcohol que se caracteriza por un deterioro del control sobre la bebida, episodios frecuentes de intoxicación y obsesión por el alcohol y su consumo a pesar de las consecuencias adversas (7). Por otro lado, **la dependencia es un conjunto de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos** que pueden aparecer después del consumo repetido de alcohol. Estos fenómenos típicamente incluyen deseo intenso de consumir alcohol, dificultad para controlar el consumo, persistencia del consumo a pesar de las consecuencias perjudiciales, mayor prioridad al consumo frente a otras actividades y obligaciones, aumento de la tolerancia al alcohol y abstinencia física cuando el consumo se interrumpe (8).

El **consumo de riesgo** es un patrón de consumo de alcohol que aumenta el riesgo de consecuencias adversas para el bebedor o para los demás. Los patrones de consumo de riesgo son importantes para la salud pública a pesar de que el individuo aún no haya experimentado ningún trastorno. El **consumo perjudicial** se refiere a aquel que conlleva consecuencias para la salud física y mental, aunque algunos también incluyen las consecuencias sociales entre los daños causados por el alcohol. El daño puede ser físico (ej. hepatitis) o mental

(ej. trastornos depresivos secundarios). El **consumo experimental** corresponde a situaciones de contacto inicial con una o varias sustancias psicoactivas, que puede ser seguida de abandono de estas o de continuidad en el consumo. La adolescencia es la etapa en que con mayor frecuencia surge este tipo de consumo, se considera que el individuo desconoce los efectos de la sustancia y que su consumo se realiza, generalmente, en el marco de un grupo que le invita a probarla. El **consumo ocasional** es el uso intermitente de una sustancia, sin ninguna periodicidad fija y con largos intervalos de abstinencia. El **uso o consumo problemático de sustancias** se refiere al uso recurrente de drogas que produce algún efecto perjudicial, para la persona que consume o su entorno, esto es problemas de salud (incluidos los signos y síntomas de dependencia), problemas en las relaciones interpersonales, incumplimiento de obligaciones, entre otros. Este tipo de consumo es considerado un indicio de abuso de drogas, por lo cual se han identificado cuatro áreas de problemas relacionados con el consumo de drogas: incumplimiento de obligaciones (laborales, académicas, familiares); riesgos de salud o físicos; problemas legales y compromiso en conductas antisociales; y problemas sociales o interpersonales (8,9). Nuestro grupo de casos lo hemos clasificado como de uso o consumo problemático de alcohol, aunque más del 50 % de los participantes quedaban circunscritos en la categoría de alcohol-dependientes.

Como lo hemos mencionado, el alcoholismo es una enfermedad primaria, compleja, crónica, progresiva y multifactorial, es decir que múltiples factores ambientales y genéticos pueden desempeñar un papel importante en su generación, progresión y permanencia. Se han relacionado diversas vías metabólicas y de señalización con variantes que se han asociado con la susceptibilidad a la enfermedad. Particularmente a nivel del sistema nervioso se han evidenciado alteraciones principalmente en los sistemas de recompensa, de motivación y de memoria, aunque pueden verse afectados otros circuitos cerebrales. El consumo de alcohol incrementa la expresión de diversas moléculas de señalización alterando procesos cognitivos y promoviendo el consumo. Hay

pérdida de masa cerebral y materia blanca que se refleja en problemas de memoria, deterioro de la conceptualización y abstracción, dificultad en procesar material complejo etc., es decir estamos en presencia de una enfermedad cerebral (10,11).

1.2 GENES INVOLUCRADOS EN LA PATOLOGIA

La susceptibilidad genética al consumo de alcohol puede tener su origen en características de personalidad tales como la ansiedad, la disforia (estado de ánimo de ansiedad, irritabilidad, inquietud) y la impulsividad que predispone al comportamiento de búsqueda de alcohol, al distinto nivel de respuesta en cada individuo al consumo del psicoactivo y a factores relacionados con respuesta al estrés. Los desórdenes de conducta pueden incrementar el riesgo en el consumo abusivo de alcohol. Muchos de los polimorfismos en genes involucrados en metabolismo del etanol, los circuitos cerebrales, neuro-inflamación aquí descritos están asociados a problemas de conducta y algunos estudios reportan hasta el 80% de alcohólicos con otros problemas psiquiátricos, es decir pacientes con enfermedad dual (11,12).

Las variantes de nucleótido simple (SNV's) son sustituciones de una base (nucleótido) por otra en la secuencia de un gen que debe estar en al menos el 1% de la población. Pueden ser marcadores genéticos ideales en la búsqueda de genes de susceptibilidad a una enfermedad o genes que determinan la respuesta a un fármaco determinado. Entre sus características generales se pueden citar: simplicidad, amplia distribución (alta frecuencia en zonas de regulación génica), estabilidad (menos susceptibles de presentar mutaciones) y alta frecuencia a lo largo del genoma (aproximadamente 10 millones en todo el genoma humano) (13–15).

Los hallazgos más robustos de la influencia genética sobre el alcoholismo están relacionados con SNV's de genes que codifican enzimas para el metabolismo del

etanol. El primer órgano encargado del metabolismo del alcohol es el hígado y en menor proporción el estómago e intestino. En ambos casos involucran la conversión del etanol a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y este último a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). En el sistema nervioso, el citocromo P4502E1 del sistema microsomal, en bebedores fuertes cobra relevancia. Existen siete genes de ADH y dieciocho genes de ALDH, pero sólo cuatro clases de genes ADH (ADH1A, ADH1B, ADH1C y ADH4) y una de ALDH (ADLH2) juegan un papel importante en su biotransformación. Todos ellos poseen numerosas variantes, de las cuales destacaremos las siguientes: El citocromo P4502E1 posee varios polimorfismos, uno de ellos situados en la región reguladora 5` del gen con la variante c1, la más frecuente y c2 (rara) que posee una tasa de transcripción mayor y está relacionada con el riesgo de consumo de alcohol. En Asia las variantes ADH1B*2, que genera una enzima con 100 veces más actividad y ALDH2*2 con menor actividad conllevan al fenotipo que presenta enrojecimiento facial, hipotensión, dolor de cabeza y náuseas y por tanto se consideran un factor de protección (13). En Colombia, nuestro grupo de investigación realizó un estudio con una muestra poblacional de la región central del país encontrando que una combinación particular de genotipos de ADH1B, ADH1C, ALDH2 y CYP2E1 podría estar llevando a la población a un posible riesgo, dado que al presentar alelos cuyo producto enzimático permite una tasa de oxidación mayor (ADH1B*2, ADH1C*1, CYP2E1c2) combinados con el genotipo homocigoto de ALDH2*1 aumentaría las tasas de aclaramiento del alcohol y acetaldehído dando como resultado una mayor tolerancia al consumo de cantidades elevadas de alcohol, siendo esto un factor de riesgo para desarrollar una dependencia. Esta característica sumada a otros factores como son los sociológicos, psíquicos y ambientales contribuyen fuertemente a la susceptibilidad de una población a la enfermedad. En general, las frecuencias obtenidas para los cuatro alelos se acercan más a lo reportado en poblaciones como las europeas, indígenas americanos y Mexicoamericanos. Estos hallazgos, de alguna manera eran esperados, ya que los primeros

asentamientos en nuestro país fueron de Amerindios, seguido de europeos especialmente españoles y finalmente de africanos, traídos como esclavos (4,16).

Los estudios realizados con modelos animales y humanos en los últimos años indican que las adicciones traen como resultado neuro-adaptaciones en el sistema nervioso central que van progresando desde la fase de consumo inicial pasando al consumo compulsivo hasta llegar al crónico y las recaídas. Los modelos de estudio en roedores han permitido identificar numerosos genes relacionados con la transmisión de señales en el sistema nervioso central, especialmente con los circuitos de recompensa. La euforia experimentada tanto por los humanos como roedores, posterior al consumo de alcohol, está asociada con el incremento de dopamina en la sinapsis en las vías de recompensa, además de incluir la alteración de otras vías de neurotransmisores como GABA, acetilcolina, glutamato, serotonina, péptidos opioides y cannabinoides (17). En población colombiana, nuestro grupo de investigación también evaluó la posible relación de algunos de los polimorfismos de genes involucrados en estas vías con la alcohol-dependencia, se obtuvo que para el grupo de pacientes con un puntaje AUDIT (test de identificación de desórdenes en el consumo de alcohol, ver más adelante) entre 14 y 19, la frecuencia del alelo -141C Ins del gen DRD2 (receptor de dopamina tipo 2) arrojó diferencias significativas al compararlo con el grupo control. Por otro lado, para el mismo gen se encontró diferencia significativa para el alelo IB del polimorfismo TaqIB en el grupo de mujeres con alcohol dependencia (5).

El sistema dopaminérgico juega un papel muy importante en la regulación del movimiento, la conducta y la liberación de hormonas. El circuito dopaminérgico cerebral se puede dividir en nigroestriado, mesolímbico-mesocortical y tuberohipofisiario. El sistema mesolímbico-mesocortical tiene su origen en el área tegmental ventral (ATV) con proyecciones hacia la corteza frontal y el lóbulo límbico, en este último se proyecta hacia el núcleo accumbens (NAc), tubérculo olfatorio, amígdala entre otros. Se ha propuesto que la liberación de dopamina en el NAc desde ATV como parte de un circuito de recompensa cerebral se asocia

con estados de ánimo positivos como el placer o la euforia. El sistema límbico contiene circuitos que no sólo codifican para la magnitud de la recompensa sino también para su almacenamiento en la memoria, al establecer las pertinentes asociaciones entre estímulos (externos e internos) y la recompensa que inducen, lo cual podría estar directamente relacionado con los estados de adicción (18–20).

Existen muchas proteínas involucradas en el metabolismo (síntesis y degradación), transporte y acción de la dopamina. El precursor de la dopamina es el aminoácido tirosina, que es convertido en dihidrofenilalanina (L-DOPA) por acción de la enzima tirosinhidroxilasa. Luego la DOPA es descarboxilada convirtiéndose en dopamina. Se han identificado varias enzimas involucradas tanto en vía sintética como en vía degradativa, cinco receptores membranales, una proteína recaptadora y varias proteínas de vesículas sinápticas. Polimorfismos en genes que codifican para estas proteínas podrían estar involucrados en la susceptibilidad al alcoholismo (20).

El gen que codifica DRD2, una variante de receptores de dopamina se localiza en el brazo largo del cromosoma 11, específicamente en la región q22-q23, consta de 8 exones y siete intrones. Se han identificado principalmente tres polimorfismos:

1. Polimorfismo DRD2 TaqIA con dos alelos 1 y 2, cambio en la región 3' dentro del exón ocho, actualmente dicho polimorfismo se ubica en el gen vecino ANKK1 codificado en contrasentido.
2. Polimorfismo DRD2 TaqIB con dos alelos 1 y 2, cambio en el extremo 5' junto al exón 2.
3. Polimorfismo DRD2-141C INS/Del, presencia o ausencia de citosina en la posición -141 en la región promotora del gen.

Existen dos subfamilias de receptores de dopamina. La subfamilia D1 que incluye a los receptores D1 y D5 y la subfamilia D2 que incluye los receptores D2, D3 y D4. Todos son proteínas de membrana acoplados a proteínas G, con un extremo

amino extracelular, siete dominios transmembranales y un extremo carboxilo intracelular. Existen diferencias en las asas que se forman entre segmentos transmembranales originando variantes proteicas estructural y funcionalmente distintas. De los receptores para dopamina todos tienen localización postsináptica, excepto el DRD2, que también es autoreceptor (ubicación presináptica) y es el que más se ha relacionado con el alcoholismo, específicamente el polimorfismo Taq1A1, que presenta una disminución postsináptica de la función y disponibilidad. Esta disminución de dopamina en el sistema de recompensa puede causar disforia, depresión o anhedonia (incapacidad para experimentar placer) y como consecuencia se podría consumir alcohol para mejorar el estado de ánimo negativo (18). También se han reportado la asociación de polimorfismos en la región 5'UTR del gen DRD1 en casos con severidad del alcoholismo y en el gen DRD4 se encuentra un VNTR (Variable Number Tandem Repeat) de 48 pb en el exón 3 y cuya variante de 7 repeticiones da una reducida respuesta a la dopamina y parece más relacionado con la búsqueda compulsiva de la bebida alcohólica y establecimiento de relaciones sociales (21).

El transportador de dopamina DAT1 (SLC6A3) es el encargado de recoger la dopamina en ambas direcciones en el punto de sinapsis, siendo normal que lo haga hacia la terminal nerviosa. Los DAT son proteínas ion sodio-cloruro dependientes que poseen 12 dominios transmembranales. El gen que codifica DAT1 está localizado en el cromosoma cinco, específicamente en la región 5q15.3, consiste en 15 exones y 14 intrones. Posee formas polimórficas en su región 3'UTR junto a la cola de poliA, es un VNTR de 40 pares de bases que se repiten de tres a trece veces, siendo las variantes de nueve y diez repeticiones las más frecuentes. Polimorfismos de nueve repeticiones (A9) se han asociado con problemas de abstinencia en la adicción al alcohol. Se ha demostrado que portadores del alelo A9 tienen una reducida densidad de la proteína DAT comparado con otros genotipos, hecho causado probablemente por descenso en su expresión (22).

La enzima COMT (catecol-O-metiltransferasa) que participa en la vía metabólica de degradación de dopamina transformándola en 3-metoxitiramina que luego se convierte en ácido homovanílico, el cual es el metabolito inactivo más importante de esta vía. El gen se ubica en 22q11.1-q11.2. La COMT presenta variantes que se diferencian en el residuo del aminoácido de la posición 158, que puede ser metionina o valina. Entre los individuos con uso problemático del alcohol se han identificado alta frecuencia de individuos con la variante met/met que tienen una menor respuesta a la β -endorfina siendo más sensibles al estrés incrementando su ansiedad y por tanto su riesgo de alcoholismo (23).

El sistema de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) podría participar en respuesta al consumo excesivo de alcohol, ya que es modulador de la excitación glutaminérgica e inhibidor de la gabaérgica. Se han reportado polimorfismos en el gen del transportador de serotonina (5-HTT), que consiste en una delección/ inserción de 44 pares de bases en su región promotora que se traduce en dos variantes con diferente actividad transcripcional, la corta (S) y la larga (L). Los alelos largos de 5-HTT (5-HTTLPR) con baja actividad transcripcional estarían asociados a la tolerancia y dependencia al alcohol (24). De igual forma, se han reportado polimorfismos en el receptor de serotonina, siendo la presencia de la isoforma HTR3B, la que representa riesgo para el consumo de alcohol y otras drogodependencias (17,25).

El aminoácido ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio que actúa sobre dos receptores conocidos como A y B. En el cromosoma 4 se encuentran los genes GABRA2, GABRA4, GABRB1 y GABRG2, en el cromosoma 5 se ubican los genes GABRA1, GABRA6, GABRB2 y GABRG2 y en el cromosoma 15 los genes GABRA5, GABRB3 y GABRG3 (26). El alcohol actúa sobre los receptores tipo A conocidos como GABRA. El receptor de GABA $A\alpha 6$ presenta dos variantes en la posición 385 pro/ser posiblemente asociados con problemas de consumo de alcohol. El consumo de alcohol podría aliviar el estado de hiperexcitabilidad del organismo, normalizándolo, el efecto es temporal

conllevando al uso frecuente y creciente de alcohol, poniendo al individuo en peligro de caer en una dependencia. Con los trabajos de genómica total, el gen candidato asociado con más frecuencia al consumo de alcohol es GABRA2 (27,28).

De igual forma, existen estudios que asocian a los opioides y a sus receptores μ -miu (OPRM1), κ -kapa (KOR) y δ -delta (DOR) con sensibilidad inicial y efectos reforzadores al consumo y el abuso de alcohol. Numerosas evidencias indican que los mecanismos de refuerzo del etanol implican, al menos parcialmente, la activación inducida por el etanol del sistema opioide endógeno. El etanol puede alterar la transmisión opioidérgica a diferentes niveles, incluyendo la biosíntesis, la liberación y la degradación de los péptidos opioides, así como la unión de los ligandos endógenos a los receptores opioides. Estos estudios comprenden encefalinas y beta endorfina como mediadores fisiológicos de las acciones del etanol en el cerebro. La importancia de los receptores opioides en el alcoholismo humano se pone de manifiesto por la asociación de los polimorfismos del receptor miu (μ) y delta (δ) con dependencia al etanol. La activación de los receptores tipo μ y δ podrían estar involucrados en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens de los alcohólicos. Han sido reportados polimorfismos en el residuo aminoacídico 40 del receptor μ con cambio de asparagina por aspartato (Asn40Asp) activando tres veces más este receptor por acción de la β -endorfina (4,29).

El glutamato se encarga de modular la actividad dopaminérgica en el núcleo accumbens. El bloqueo de los receptores de glutamato tipo NMDA aumenta la liberación de dopamina dependiente del estímulo del estriado (30,31). El alcohol inhibe la acción de los receptores de glutamato NMDA (NMDAR). Las formas polimórficas NMDAR1 y NMDAR2 difieren entre sujetos alcohólicos y no alcohólicos, aunque no han encontrado en todas las poblaciones estudiadas (31). De igual forma se han encontrado polimorfismos en el transportador de glutamato EAAT2 asociados con el alcoholismo (32).

En la actualidad, el tratamiento del alcoholismo está enfocado en aspectos conductuales, quedando en segundo plano los tratamientos de tipo farmacológico, quizás debido a sus pobres resultados. A pesar de lo anterior, se han adelantado numerosos trabajos relacionados con la determinación de perfiles genéticos y la respuesta al tratamiento farmacológico en el alcoholismo. Como es conocido, no todas las personas responden de igual forma a un tratamiento farmacológico para una determinada patología, y el alcoholismo no es la excepción. Los resultados en el tratamiento farmacológico son contradictorios y esto pueden tener su origen en la diversidad genética y la presencia de variantes genéticas en los genes de los receptores o enzimas relacionadas con la biotransformación o la transducción de señales de la acción del alcohol (33,34). El avance en el estudio y análisis de variantes genéticas empleando las nuevas tecnologías de estudio del ADN y sus productos de expresión han permitido la identificación de un gran número de genes candidatos y variantes genéticas relacionadas, además de variantes no relacionadas con la secuencia, es decir factores epigenéticos (ver tabla 1-1).

Tabla 1-1 Hallazgos moleculares relacionados con el alcoholismo empleando las nuevas tecnologías de genética molecular.

Estudio	Hallazgos
Estudio de haplotipos, 2008 (35)	Análisis basado en un panel de 130 genes de interés para el alcoholismo. La inclusión de los 186 marcadores informativos de ascendencia permite la detección y corrección de la mezcla y mejora aún más la utilidad de la matriz.
Estudio de GWAS, Treutlein, 2009 (36)	Se analizaron 524 individuos. 396 SNV's en pacientes de Alemania, 121 SNV's asociados al alcoholismo. Además de incluir un modelo animal.
Tabakoff, 2009 (37)	Modelo animal, 1350 SNV's, hallaron 8 SNVs asociados al alcoholismo en poblaciones de Canadá y Australia.
Bierut, 2010 (38)	1897 sujetos europeos y afroamericanos, hallaron 15 SNV's asociados al alcoholismo. El principal gen candidato es GABRA2.
Edenberg, 2010 (39)	Estudios COGA, 133 SNV's, asociación de un grupo de genes en el cromosoma 11 (SLC22A18,

	PHLDA2, NAP1L4, SNORA54, CARS y OSBPL5) con la dependencia del alcohol.
Estudio de GWAS, Kapoor, 2011 (40)	Estudio COGA, 199 SNVs, genes asociados a al alcoholismo en los cromosomas 8 y 13.
Estudio de metilación, Zhang, 2013 (41)	Estudio de metilómica. 1702 CpG, hipometiladas, 8 hipermetiladas.
Estudios genómico, transcriptómico y metilómico 2014 (42)	Identificaron 35 genes candidatos que exhiben interacciones gen/medio ambiente. Encontraron 241 variantes de un solo nucleótido (SNV) en 16 promotores, de los cuales 186 SNV (15 promotores) alterarán la unión de factores de transcripción.
Estudio de GWAS, Gelernter, 2014 (28)	Pacientes de USA (caucásicos y afro) y alemanes: genes de riesgo, la familia ADH, se estudiaron > un millón SNV's.
Estudio de GWAS, 2014, Levey(43)	Pacientes de Alemania, 135 genes candidatos, 713 SNV's asociados al alcoholismo.
Metaanálisis, Zuo, 2017 (44)	Metaanálisis, 12481 sujetos de Europa y Australia, 10 SNV's asociados con alcoholismo.
GWAS en USA, Gelernter, 2019(45)	SNV's asociados con el consumo de alcohol en población blanca y negra de USA. Genes relacionados: ADH1B, CRHR1, FGF14.
Estudio de transcriptómica, Kapoor, 2019(46)	Identificaron 129 genes que mostraban expresión alterada en sujetos alcohólicos. Vías relacionadas con la señalización del interferón, de GADD45, del calcio, de la respuesta a la nicotina y la señalización de opioides. Además de vías relacionadas con la señalización inmunitaria.
Estudio GWAS, 274.424 individuos consumidores de alcohol, Kranzler, 2019(47)	Identificaron 18 loci significativos en todo el genoma: 5 asociados con ambos rasgos, 8 asociados solo con AUDIT-C y 5 asociados solo con el diagnóstico AUD.
GWAS: metaanálisis del uso problemático del alcohol con otras patologías psiquiátricas, Zhou, 2020 (48)	Hallaron 24 variantes en 23 loci, entre los cuales destacan ADH1B, ADH1C, ALDH2, SLC39A8, GCKR y CRHR1
La identificación de las variantes causales y los genes subyacentes a los loci del estudio de asociación del genoma completo (GWAS) y trastorno del uso de alcohol, 2021(49)	Se identificaron dos genes, primero SPI1 en las células mieloides que reduce el riesgo de AUD y también se identificó a MAPT como un gen causal candidato asociado.

1.3 EXPRESIÓN GÉNICA EN EL ALCOHOLISMO

Ensayos para determinar el efecto del alcohol en animales de laboratorio muestran cambios en la expresión y función de los genes y proteínas. Resultados similares se han obtenido en humanos (37,50). El fenotipo de adicción puede persistir durante toda la vida de un individuo e incluso presentar recaídas después de muchos años de abstinencia. Esto sugiere que el “alcohol” causa alteraciones moleculares multisistémicas, particularmente en el cerebro, que perduran largos periodos de tiempo. Estos cambios corresponden a estados de adaptación que inducen las drogas psicoactivas como el alcohol e incluyen activación o inhibición de factores de transcripción, modificación de la cromatina y estructura del ADN, e inducción de ARN no codificante (51,52).

Aunque las diferentes sustancias psicoactivas difieren en su mecanismo de acción, virtualmente todas incrementan la actividad dopaminérgica desde VTA al NAc y a otras regiones límbicas del cerebro. Son numerosos los genes, cuya expresión se ve alterada por consumo de bebidas alcohólicas. Entre los principales factores de transcripción afectados por el consumo de psicoactivos como el alcohol tenemos:

Δ FOSB: (miembro delta de la familia Fos de factores de transcripción) factor de transcripción inducible por efecto de sustancias psicoactivas y el más estudiado y estable de todos los factores de transcripción hasta el momento relacionados, es indispensable y suficiente para generar cambios en los circuitos de recompensa por exposición crónica a “drogas”. Por ejemplo, la ingesta crónica de alcohol induce a Δ FOSB en células del núcleo accumbens, del cuerpo estriado dorsolateral y de la corteza orbitofrontal, siendo un importante blanco terapéutico. La administración sistémica de naltrexona reduce significativamente el consumo

voluntario de etanol y la actividad de FosB/ Δ FosB inducida por la ingesta voluntaria crónica de etanol (53).

NFkB: (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) factor de transcripción que se encuentra en casi la totalidad de células y se encarga principalmente de dar respuesta a los estímulos de estrés. En el sistema nervioso está involucrado en la respuesta inflamatoria, plasticidad sináptica y memoria, entre otros, con alteraciones durante situaciones de adicción a sustancias psicoactivas (54).

MEF2 (myocyte Enhancer Factor 2): factor de transcripción involucrado en diferenciación de células musculares, aunque también se expresa en cerebro y juega un importante papel en respuesta al estrés y se ve afectado por la acción del etanol y regula enzimas tipo HDACs. MEF2 está estrechamente asociada con varias vías de señalización, incluida la señalización del ion Ca^{2+} , la señalización de la MAP quinasa y los genes *WNT* y *PI3K/Akt*, etc. (55).

CREB (elemento de respuesta a cAMP): factor de transcripción inducible por efecto de sustancias psicoactivas. Se postula como un neuro-mecanismo dependiente de CREB que subyace al comportamiento de consumo excesivo de alcohol y de gran ansiedad (56). Como uno de los principales mediadores de los efectos gratificantes del alcohol, se han identificado alteraciones en la vía de señalización de la dopamina en la región cerebral VTA con proyecciones hasta el NAc. La exposición aguda a alcohol estimula la liberación de dopamina en el NAc, que activa los receptores de dopamina, la estimulación de la señalización de proteinquinasa A (PKA) y la posterior expresión génica mediada por CREB. Mientras que la exposición crónica de alcohol conduce a una regulación a la baja de adaptación de esta vía, en particular de la función de CREB. La función de CREB disminuida en el NAc puede promover el consumo de drogas de abuso para lograr un aumento en la recompensa y por lo tanto pueden estar involucrados en la regulación de los estados afectivos positivos de la adicción. Alteraciones en la señalización mediada por PKA, también afecta la actividad del

receptor NMDA y puede desempeñar un papel importante en neuro-adaptación en respuesta a la exposición crónica al alcohol (51).

Los estudios con genes candidatos y particularmente los ensayos con SNV's en humanos no son suficientes para explicar los mecanismos tan complejos del efecto neurotóxico del alcohol y los diversos fenotipos del alcoholismo. A pesar de la complejidad del panorama, los estudios de genómica total, expresión génica (transcriptómica y proteómica) nos muestran algunas redes íntimamente ligadas con los cambios funcionales que se presentan. Mediante técnicas de microarreglos y neuroproteómica se analizó la expresión génica en la corteza prefrontal de tejidos humanos postmortem de individuos con historial de adicción a distintos psicoactivos, incluido el alcohol, encontrando alteración significativa en genes de distinta localización y función celular, además de los ya mencionados anteriormente del metabolismo y sistema de recompensa, se han descrito genes de transducción de señales (CREB1, MAPK1, NTRK2, SOD2), genes de inflamación (TNFR1, IL-1R, IL-6R, TLR2, TLR4 y NF κ β), genes inmunitarios y de otras vías como la vía de señalización de calmodulina, genes de transito del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, genes estructurales del citoesqueleto, adhesión celular, receptores nucleares y moléculas que modulan la plasticidad neuronal, la memoria y arquitectura dendrítica (37,43,57,58).

1.4 ASPECTOS EPIGENETICOS DEL ALCOHOLISMO

La gran evidencia acumulada, aunque con resultados contradictorios y con gran heterogeneidad, más la concordancia incompleta entre gemelos monocigóticos en respuesta al alcohol, sugiere que factores ambientales y epigenéticos son importantes en la susceptibilidad al abuso de este psicoactivo. Además, los resultados tan distintos, contradictorios y con escasa reproducibilidad en estudios de polimorfismos genéticos asociados al alcoholismo nos hacen pensar que,

quizás añadido a la heterogeneidad génica propia de las enfermedades de herencia multifactorial, las diferencias se deban a alteraciones en un nivel diferente al de la secuencia del ADN. Nos estamos refiriendo a la expresión (transcripción y traducción) o a su regulación o a la interacción de genes y variables ambientales como las metabólicas, a otras enfermedades concomitantes, al estado nutricional, al estado de la microbiota intestinal etc. (59,60). El alcohol y sus “metabolitos” pueden causar cambios epigenéticos alterando el estado de metilación del ADN, modificando las histonas y la expresión de miRNA contribuyendo al daño causado por el alcohol en numerosas vías celulares (52,61,62).

La epigenética corresponde a los cambios químicos que sufre la cromatina (ADN y/o proteínas) sin alterar la secuencia de ADN, aunque alterando su expresión. Entre los mecanismos epigenéticos podemos citar la metilación del ADN, ADP-ribosilación, sumoilación, acetilación, metilación, fosforilación, deaminación, isomerización, ubiquitinación de las histonas, expresión de microARN's (miRNA) y ARN largos no codificantes, entre otros. Casi el 50% de estudios epigenéticos hacen referencia a la metilación del ADN por ser cambios más estables y técnicamente más fáciles de realizar, mientras la obtención de muestras adecuadas y su procesamiento para los otros tipos de estudios epigenéticos es más compleja(62–64).

La modificación de histonas es un complejo código de acceso a genes individuales por parte de maquinaria transcripcional. La acetilación de histonas por las acetiltransferasas (HTAs) está asociada a la activación de genes, mientras la metilación por histonas metiltransferasas (HMTs) está asociada tanto a activación como a represión. Ambos procesos pueden ser reversibles por acción de las histonas deacetilasas (HDACs) e histona demetiladas (HDMs), respectivamente (51).

En el genoma de mamíferos alrededor del 75% de dinucleótidos CpG metilados se encuentran principalmente en elementos repetitivos y de regulación génica,

además alrededor de la mitad de los genes están asociados a islas CpG y su estado de metilación depende de factores externos como la dieta, estilo de vida y de condiciones clínicas específicas(65). Con esto se quiere decir, que la regulación epigenética podría ser un factor importante en esta patología de alcohol-dependencia, como lo muestran algunas de las evidencias que se listan a continuación:

1. El alcohol altera la metilación del ADN de tres formas: por inhibición de las ADN metilasas, interfiriendo el metabolismo de carbohidratos por cambios en el estado redox de las células y/o limitando la disponibilidad de ácido fólico que disminuye la concentración de SAM (S-adenosilmetionina)(66). Todo lo anterior lleva a un estado de hipometilación generalizado en el organismo de consumidores crónicos de alcohol. Por ejemplo, la metilación del ADN cambia la actividad de promotores alterando la transcripción de genes. La habilidad del alcohol de alterar los patrones de metilación del ADN genera hipometilación global debida a la reducción de los niveles de SAM que es concordante con lo que se observa en otras patologías como el cáncer. Ejemplos de genes que muestran este comportamiento son: la α -synucleina (SNCA), monoaminoxidasa A (MAO A), el transportador de serotonina (SLC6A4), la subunidad 2B del receptor de N-metil-D-aspartato, la proopiomelanocortina (POMC), la prodinorfina, entre otros, muestran diferencias de patrones de metilación entre controles y pacientes con dependencia al alcohol (59).

2. Los medicamentos zebularine y 5-aza-2-deoxicitidina bloquean las DNA metiltransferasas (DNMT). Su inhibición altera la metilación del promotor de BDNF y reelina implicados en la plasticidad en el hipocampo en respuesta al alcohol (67).

3. El alcohol ejerce sus efectos porque produce modificaciones en la remodelación de la cromatina en múltiples órganos incluido el hígado, por ejemplo, la disminución en la acetilación de la lisina 9 o la fosforilación de serinas 10 y 28 por MAPK en la histona H3 que están relacionadas con el incremento de

la expresión del mRNA de HDAC2. El acetato, producto de la transformación del acetaldehído puede pasar a acetilCoA y acetilar histonas en presencia de HAT's (68,69).

4. En los últimos años se han desarrollado trabajos de casos/control que muestran la alteración en estados de metilación en islas CpG de números genes de pacientes con uso problemático del alcohol, particularmente los relacionados con respuesta inflamatoria (59).

5. Durante el consumo excesivo de alcohol la relación NADH/NAD^+ , la concentración de ROS (especies reactivas de oxígeno), la concentración de acetato, pueden verse alteradas y afectar enzimas de acetilación dependientes de NAD^+ (por ejemplo HDAC, histona deacetilasa) que controlan la expresión génica de diversas vías, incluso la muerte celular programada (70).

6. El alcohol altera niveles de metabolitos y cofactores como el NAD^+ , ATP, acetilCoA y SAM que contribuyen al control de la expresión génica. Enzimas como DNA metil transferasas (DNMTs), histona acetiltransferasas (HATs), histona metil transferasas (HMTs) e histona demetilinasas (HDMs) son reguladas, en parte por sus sustratos y cofactores antes nombrados y actúan modificando las histonas y estas últimas actúan finalmente como sensores metabólicos alterando la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN (69).

7. La expresión de miRNA's puede ser alterada por el alcohol y jugar un papel importante en la pato-fisiología del alcoholismo. Algunos ejemplos de esta situación: El alcohol altera la permeabilidad intestinal hacia LPS y este activa a TLR-4 en células de Kupffer promoviendo la síntesis de miRNA-155 activando al factor NFkB que promueve la liberación de $\text{TNF-}\alpha$. Por otro lado, en hepatocitos miRNA-155 inhibe la expresión de PPAR-gamma afectando el metabolismo de ácidos grasos (61). La hipometilación del promotor de miRNA-34A inducida por el etanol cambia los patrones de expresión de genes como CASP2, SIRT1, MMP2 y MMP9 relacionados con la supervivencia de los hepatocitos (71). También se desregulan miRNA-212 y miRNA-122a que pueden altear la permeabilidad

intestinal afectando las proteínas ocludinas, miRNA-122 aumenta en plasma y está correlacionado con cambios en la alanina aminotransferasa (61). Son numerosos los miRNA's secretados en sangre durante el consumo de alcohol, particularmente miRNA-27a es secretado en exosomas e induce la activación de monocitos a macrófagos por la vía del ERK (58).

8. Estudios en humanos y animales de laboratorio han permitido demostrar que, tanto el consumo crónico como agudo de alcohol afecta muchos aspectos del ciclo circadiano como la expresión de genes, funciones fisiológicas, endocrinas y de comportamiento. Hay características particulares de las adicciones como la recaída que difícilmente se explica por aspectos genómicos; hoy en día hay evidencias que cambios en la regulación de enzimas relacionadas con alteraciones epigenéticas, metilación o acetilación podrían explicar estos fenómenos(72,73).

9. En las enfermedades multifactoriales, los cambios epigenéticos explican mejor la progresión de la enfermedad que los polimorfismos y/o variantes (mutaciones). Además los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles y por tanto potentes candidatos para intervenciones terapéuticas (74). Esta es una de las causas, por lo que la atención se ha volcado hacia este tipo de estudios.

1.5 TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL ALCOHOLISMO

La farmacogenética, epigenética, farmacogenómica y epigenómica pueden ser usadas en el tratamiento personalizado del alcoholismo y los últimos trabajos científicos relacionados con el tema se han enfocado en el descubrimiento de varios blancos terapéuticos empleando sus herramientas particulares de estudio. Algunos de esos blancos, son el receptor opioide tipo μ y el transportador de serotonina. Existen tres tipos de receptores de opioides μ , κ y δ que producen

efectos biológicos. El exón 1 del gen del receptor opioide μ (OPRM1) posee variantes que hacen que la respuesta al alcohol y a los tratamientos cambie de manera modesta. Existe un polimorfismo A118G que codifica una sustitución Asn40Asp en el dominio extracelular del receptor y hace que cambie su funcionabilidad con pérdida o ganancia, estudios controversiales(75). Además, la frecuencia del polimorfismo varía según la población que se estudie, pero el efecto en general consiste en que los poseedores de la variante Asp40 experimentan al momento de administración de alcohol una mayor intoxicación, estimulación y placer que los poseedores de la variante alternativa Asn40. Entre los bebedores fuertes, los poseedores de la variante Asp40 experimentan mayor ansiedad que quienes no la poseen. Los pacientes con al menos un alelo que codifique para Asp40 con tratamiento con naltrexona tuvieron menos recaídas que los poseedores de las restantes variantes (75).

Las investigaciones también se han centrado en el gen SLC6A4, que codifica el transportador de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HTT). Un polimorfismo en la región del promotor de 5-HTT, una inserción de repeticiones de 44 nucleótidos de longitud que genera dos posibles alelos, uno largo (L) y el otro corto(S) que están asociados a una gran y baja actividad transcripcional, respectivamente. También se presenta un SNV en la versión larga, un cambio de A/G, conocida como el alelo L_G cuya actividad es similar a la del alelo S. Pacientes tratados con ondansetron y sertralina con los alelos LL y el SNV TT en la región 3'UTR consumían menos alcohol por día y los días de abstinencia eran mayores que en los poseedores de los demás genotipos(76). Finalmente se ha reportado análisis bioinformáticos asociados a estudios con humanos y ensayos de expresión en ratones que revelan modulación edad-específica del consumo de alcohol por vía neuro inmune con minociclina (77), trabajo que generó gran expectativa pues sus resultados muestran que el análisis bioinformático de la expresión génica puede generar nuevas hipótesis capaces de ser escaladas a un tratamiento individualizado al alto consumo de alcohol con fármacos existentes en el mercado. En la tabla 1-2 se resume los principales fármacos empleados en el

tratamiento del alcoholismo y sus efectos, muchos de los cuales tienen blancos en las vías anteriormente descritas.

Tabla 1-2 Fármacos que se emplean en el tratamiento del alcoholismo y sus principales efectos y/o recomendaciones de uso.

FÁRMACO	EFEECTO Y/O RECOMENDACIONES
Disulfiram (78,79)	Inhibidor de Aldehído deshidrogenasa Usar en pacientes altamente motivados en abstinencia No usar en hepatopatías y nefropatías
Acamprosato (80)	Antagonista del receptor N-Metil-D-aspartato glutamato Anti-ansiedad Reducción de episodios en “bebedores fuertes” Evitar en pacientes con nefropatías
Naltrexona (81)	Antagonistas de los receptores opioides tipo miu y kappa. Reducción de episodios en “bebedores fuertes” Anti-ansiedad. Evitar en pacientes con hepatopatías
Nalfeme (82)	Antagonista de receptores opioides miu y delta Agonista parcial de receptores kappa Para bebedores frecuentes. No usar en abstinencia
Ondansetron (83)	Antagonistas de receptores de serotonina 5-HT ₃ Reduce consumo de alcohol. Anti-ansiedad
Sertralina (84)	Inhibidor de recaptación de serotonina
Oxibato de sodio (85)	Agonista de receptores GABA B Suprime el síndrome de abstinencia
Topiramato (86)	El topiramato ejerce acciones sobre los canales de sodio dependientes de voltaje, los receptores GABA y los receptores de glutamato. Efectos anti-bebida. No requiere abstinencia.
Aripipazol (87)	Agonista parcial DRD2.
Rimonabant (88)	Bloqueadores de receptores CB1 de cannabinoides
Bromocriptina (89)	Agonista del receptor de dopamina
Gabapentina (90)	La gabapentina inhibe la liberación de neurotransmisores excitatorios. Reduce consumo de alcohol. Control de signos de abstinencia.
Bupropión(91)	Antidepresivo y para ayudar a dejar de fumar. También se empleado en el tratamiento de otras dependencias. El bupropión reduce el nivel del mediador inflamatorio TNF-alfa.

En la tabla 1-3 se resumen las principales variantes génicas (polimorfismos) encontradas en genes que afectan la respuesta a diferentes fármacos empleados

en el tratamiento de alcohol-dependencia y refuerzan el planteamiento de la necesidad de realizar pruebas genéticas y conocer las variantes génicas de un individuo previas a la formulación de medicamentos.

Tabla 1-3 Principales variantes (polimorfismos) de proteínas involucradas en señalización o metabolismo del alcohol, dianas farmacéuticas actuales.

GEN Y SNV	ALTERACIÓN
OPRM1 (receptor opioide μ) posición 118 A >G	Mayor afinidad por naltrexona. Cambio en la posición 40 de Asn/Asp, Pacientes con G responden mejor al tratamiento con naltrexona, menor número de recaídas (66).
DRD2, TaqIA, polimorfismo A1 ANKK1, TaqIA	Menor disponibilidad de receptores cerebrales de dopamina. En homocigotos para A1 es más eficaz el acamprosato. Mientras, que en homocigotos para A2 es más eficaz la naltrexona. Homocigotos para A1 tratados con bromocriptina presentan menos "ansiedad"(18,21).
DRD4, VNTR	Se encontró que un VNTR de DRD4 Exon III interactúa con bupropión para influir en la posible abstinencia. Poseedores de >7 repeticiones presentan recaídas más fácilmente (77).
SLC6A4, ins/del 44 pb en promotor, Alelos L y S	Mejor respuesta al tratamiento con ondansetrón y sertralina en los homocigotos para L (76).
GRABA2 A por G (ra279858)	Homocigotos para A responden mejor a la psicoterapia (26,27,92).
GABRG3	Receptor de GABA, bajas concentraciones de alcohol alteran su expresión. Blanco terapéutico para bumetanida (26,92).
EAAT1 y 2	Blanco de bloqueadores de transportadores de glutamato. Algunas variantes están asociadas con alcoholismo (93,94).
NPY leu7pro	Polimorfismo asociado a alcoholismo en poblaciones nórdicas (95).
GRABA6, T1519C	Portadores de C responden mejor al acamprosato. Portadores de T responder mejor a la naltrexona (81,96,97).
GRIK1	Relación con efectos adversos por Topiramato (86).

1.6 ALCOHOLISMO E INFLAMACION

El sistema inmune es esencial para combatir las infecciones, además de serlo en la respuesta inflamatoria, la cual puede ser benéfica o catastrófica para el organismo. Son bien conocidas las enfermedades humanas con base inflamatoria (ateroesclerosis, asma, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis reumatoide etc.). En las dos últimas décadas se ha ampliado el conocimiento sobre la producción y efecto de las citoquinas proinflamatorias y la producción de ROS en el alcoholismo y sus efectos en diversos órganos como huesos, músculos, corazón, pulmón, cerebro etc. Al verse el alcoholismo como una condición inflamatoria abre la posibilidad de utilizar nuevos agentes terapéuticos para tratar algunos de los efectos perjudiciales de esta enfermedad (98).

Quizás uno de los órganos más afectados por el consumo crónico y abundante de alcohol es el cerebro en donde se evidencia claramente la respuesta inflamatoria. La corteza prefrontal y el sistema límbico son particularmente vulnerables a los efectos neurotóxicos del alcohol. El consumo repetitivo y abundante de alcohol lleva a cambios en el cerebro y en el comportamiento que se caracterizan por disminución en el control de la bebida, incapacidad para evitar situaciones negativas con consecuencias perjudiciales, además del incremento en la preocupación por el consumo de alcohol, la búsqueda incontrolada del mismo, entre otros. El sistema neuro-inmune responsable de dicha respuesta hace alusión al sistema inmune y a las células del tejido nervioso y a sus productos, moléculas de señalización, que ayudan a regular la respuesta inmune en el sistema nervioso. Las células de la glía del sistema neuro-inmune son activadas por el estrés y por factores ambientales como el alcohol induciendo la expresión de genes involucrados en la inmunidad innata. Variantes específicas de genes relacionados con esta respuesta inmune están asociadas con el riesgo genético de padecer adicción al alcohol (99).

Las células de la glía (astrocitos y microglía) al igual que las células del sistema inmune periférico contribuyen en la respuesta inmune del sistema nervioso con la producción de citoquinas y quimiocinas (proteína quimotáctica de monocitos (MCP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 β , interleuquina 6 (IL6), receptores tipo Toll (TLR's) y proteínas tipo HMGB1) que se ven incrementadas con el consumo crónico de alcohol, es decir se altera al alza la expresión de estos genes proinflamatorios. Uno de los blancos moleculares de estas moléculas de señalización es el factor de transcripción NF κ B. Como consecuencia aumenta la actividad de enzimas tipo NOX (NADPH oxidasas), COX (ciclooxigenasa), iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y proteasas como TACE. De esta forma, el alcohol de forma similar al estrés puede inducir genes de respuesta inmune(100).

La pato-fisiología de la adicción al alcohol es desconocida, con un conocimiento bastante fragmentado involucrando múltiples órganos y tipos celulares. En los últimos años se ha reportado a las citoquinas y sus vías de señalización como moléculas que juegan un importante rol en esta patología. Las citoquinas son proteínas multifuncionales que juegan un papel crítico en la comunicación y activación celular, se han clasificado como proinflamatorias y antiinflamatorias. Es sabido que el alcohol altera los niveles de citoquinas en diversos tejidos, su consumo crónico promueve la producción de citoquinas proinflamatorias y respuesta inflamatoria en diversos órganos. Estos cambios contribuyen a la fibrosis hepática y a la cirrosis, entre otros. Igualmente afectan el cerebro con cambios a largo plazo en el comportamiento y la neurodegeneración (101).

Como se afirmó anteriormente, el alcohol afecta numerosos órganos, siendo el cerebro el principal blanco en circunstancias que implican el consumo crónico, prolongado. Los estudios actuales están enfocados en entender el efecto neurotóxico del alcohol en el cerebro y los factores genéticos de riesgo asociados a su mal uso. El uso crónico del alcohol resulta en daño neuropatológico heterogéneo en el cerebro, siendo más susceptible la corteza prefrontal, alteraciones que en parte son mediadas por cambios en la expresión de genes.

Son numerosos los mecanismos de regulación génica, variantes en la región promotora, en la región 3'-UTR de los genes de interés, blanco de muchos microRNAs etc. que pueden estar relacionados con la respuesta adaptativa del organismo a la ingesta prolongada de alcohol (100).

El etanol altera en el cerebro, la expresión de genes de neuroinflamación ya sea en el proceso de transcripción del mRNA, a nivel postranscripcional (microARN) o postraducciona a nivel de las proteínas. Para ello puede recurrir a la transferencia de este tipo de moléculas desde la sangre o las producidas por los astrocitos y las células de la microglía del cerebro, estos últimos macrófagos residentes en el cerebro, primera línea de defensa del sistema neuroinmune. El etanol induce la hiperramificación de la microglía alterando sus perfiles de expresión génica con el incremento de la liberación de citoquinas proinflamatorias y otras moléculas de señalización (102).

El consumo de cantidades elevadas de etanol y de manera prolongada exacerba la respuesta inmune, se ha observado que los niveles de endotoxinas séricas crecen debido al aumento de la permeabilidad intestinal. En humanos se ha demostrado que un componente de las bacterias de la biota intestinal llamado lipopolisacárido (LPS) puede inducir genes de neuroinmunidad causando estados de depresión y ansiedad muy similares a los observados durante el abuso del alcohol o alcoholismo(103). Las citoquinas proinflamatorias en sangre son activamente transportadas a través de la barrera hematoencefálica y estimulan las células endoteliales del cerebro con producción de más citoquinas. El suministro de una dosis de LPS incrementa los niveles de mRNA y proteínas tipo TNF- α en hígado, sangre y cerebro. Estos niveles se mantienen en hígado y sangre durante 24 a 48 horas, mientras la respuesta cerebral persiste por al menos 10 meses. Estos niveles elevados de citoquinas por meses llevan a degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra que conduce a la hipofunción dopaminica y sensibilización del sistema de recompensa al

alcohol. La sensibilización del sistema neuro-inmune cumple un importante papel en la patogénesis de los desórdenes de consumo de alcohol (104).

La inflamación periférica puede impactar el cerebro por tres vías. En primer lugar, una ruta neural, el nervio vago puede ser sensible a IL-1 β transmitiendo señales al sistema nervioso central promoviendo los cambios comportamentales. Una segunda ruta es la humoral, que incluye la difusión de citoquinas a través de la barrera hematoencefálica y finalmente, la tercera ruta es celular, por la cual células activas como monocitos ingresan al cerebro. La expresión del factor de transcripción NF κ B es incrementada por el consumo de alcohol y como consecuencia de ello igualmente la de múltiples enzimas y citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, iNOS, NADPH OXIDASA, TACE y tPA. El etanol al inducir la expresión de IL-1 β , IL-6 y TGF β -1, estimula la apoptosis celular. El incremento de TGF β -1 ocasiona el aumento en la expresión del factor E2F1, reduciendo la expresión de ciclina D1 que regula la Cdk4 (ciclina dependiente de quinasa-4) lo que eleva las proteínas proapoptóticas mitocondriales bak, bad y bcl-xs y la enzima apoptótica caspasa-3 (105).

Los mecanismos que regulan la inducción de la expresión de genes de neuro-inflamación en diversas regiones cerebrales durante el consumo prolongado de alcohol son pobremente entendidos. Se debe tener en cuenta que la activación neuro-inmune parece estar involucrada en las últimas etapas del consumo excesivo de alcohol y que se requiere beber en exceso para activar el sistema innato. Por otro lado, el alcohol induce estrés oxidativo en las neuronas por incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución de antioxidantes como el glutatión y descenso en la actividad de enzimas como glutatión peroxidasas, catalasa y superóxido dismutasa (106).

La microglía y astrocitos liberan masivamente HMGB1 (High mobility group protein) factor nuclear de unión a la cromatina que genera hiperexcitabilidad alterando la plasticidad sináptica. Además, que activa la vía de TLR4 y TLR3 que aumentan la sensibilidad neuronal hacia el glutamato. Los TLR's y otros

receptores de citoquinas comparten cascadas de señalización en el cerebro que convergen en NFκB. Recientemente se ha evidenciado la actividad del etanol sobre la interacción entre miRNA let-7 y HMGB1 reduciendo su unión con RISC (107).

El estado inflamatorio y el estrés crónico pueden reducir la neuro-génesis y causar depresión en donde múltiples genes de neuro-inflamación son regulados al alza en cerebros de pacientes alcohólicos lo que contribuye a su neurodegeneración. Estudios farmacológicos también han demostrado el papel de TLR-4 en la respuesta inmune desencadenada por el alcohol. Fármacos como la naltrexona y naloxona, antagonistas de receptores de opiáceos, empleados en el tratamiento del alcoholismo tienen efectos anti-TLR4. El descubrimiento del mecanismo neuroinmune de la acción del alcohol en el sistema nervioso central, es decir el papel de la vía de señalización HMGB1/TLR y sus cambios cascada abajo que provocan la inducción de genes de neuroinflamación y alteraciones epigenéticas, presenta una nueva aproximación hacia el tratamiento de desórdenes del abuso de alcohol (108).

A continuación, se describirán algunas de esas moléculas de señalización de importancia en la respuesta inflamatoria y/o inmune durante el consumo de alcohol y que se constituyen en genes candidatos en el estudio de la enfermedad.

1.1.1 ALFA SINUCLEÍNA

La alfa sinucleína (SNCA) hace parte junto con las formas beta y gamma de una familia de proteínas sinápticas que juega un papel importante en procesos de neuroprotección y neurotoxicidad, todo depende de sus niveles de expresión. Es

codificada por el gen *SNCA* localizado en el brazo largo del cromosoma cuatro en la posición 4q22.1, se organiza en 10 exones, el tamaño de los cuales oscila entre 42 y 1110 pares de bases para una longitud total de cerca de 117 kb (109).

El producto del gen *SNCA* es una proteína, abundante que representa el 1% de las proteínas solubles en citosol a nivel cerebral (97,98); se expresa principalmente en las terminales nerviosas pre sinápticas del cerebro y en bajas concentraciones en todos los demás tejidos, exceptuando el hígado (109). La α -sinucleína humana se encuentra en al menos cuatro variantes de corte y empalme diferentes para la síntesis de polipéptidos funcionales (111). La variante predominante en humanos está compuesta de 140 residuos de aminoácidos cuyo ARNm se sintetiza de la transcripción y procesamiento de 6 exones (112), la segunda isoforma es de 126 residuos de aminoácidos y es producida por la exclusión del exón 3, la tercera isoforma es de 112 residuos de aminoácidos producto de la exclusión del exón 5 y la cuarta isoforma es de 98 aminoácidos con delección de los exones 3 y 5. La alfa sinucleína se encuentra en el citosol interactuando con la membrana plasmática, membrana mitocondrial e igualmente asociada a la membrana de retículo endoplásmico. Se cree que participa en transporte intracelular, movilidad de vesículas sinápticas y muerte celular programada en células del sistema nervioso. También participa en la síntesis y secreción de dopamina en el cerebro(109,112).

Distintos estudios han encontrado que la alfa sinucleína se expresa de manera diferencial en las terminales presinápticas en cerebros de consumidores crónicos de alcohol desempeñando un rol importante en la neuro-transmisión dopaminérgica en etapas de la adicción al alcohol como en la búsqueda compulsiva, abstinencia y reforzamiento. La ausencia de alfa sinucleína aumenta la sensibilidad del sistema de recompensa del cerebro en el consumidor crónico. Los niveles de alfa sinucleína en cerebro aumentan 48 horas después de la abstinencia demostrado en modelos animales y humanos, aunque aún hay dudas de su correlación con los niveles sanguíneos (113). Por otro lado, la alfa sinucleína una vez fuera de la célula nerviosa se pliega de manera errónea y

algunas de estas formas activan la microglía, principal mecanismo de defensa en el sistema nervioso central. Desafortunadamente este proceso puede tornarse crónico y convertir la continua inflamación en perjudicial para el cerebro del paciente (114).

Se han encontrado numerosas variantes genéticas en diferentes regiones del gen de SNCA, en región promotora e intrón 2, particularmente destacamos las variantes: rs2583988, rs2619363, rs2736990 y rs2619364 (variantes de nucleótido simple, SNV) asociados principalmente a enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Con alcoholismo, en el promotor se ha asociado principalmente la variante Rep-1, un polimorfismo de repetición dinucleotídica codificado como D4S3481 ubicado 10 kB corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. En la mayor parte de las poblaciones prevalecen variantes de tres alelos: corto (259pb), mediano (261pb) y largo (263 pb), el tamaño puede variar dependiendo del juego de iniciadores empleados en su determinación. Entre más corto el alelo, menor es la expresión del gen y mayor es la predisposición al deseo de consumo de alcohol y por tanto a caer en dependencia. El consumo excesivo de alcohol lleva al aumento de la expresión de SNCA aumentando el riesgo de enfermedades neurodegenerativas, sobre todo en aquellos individuos que poseen variantes de fácil agregación, especialmente con ciertos SNV's en la región codificante del gen (112,115).

Por otro lado, los microRNAs se expresan de forma abundante en el cerebro donde cumplen su función de reguladores de la expresión de genes, particularmente los microRNAs: miR-7 y miR-153 están sobre expresados en cerebros de alcohólicos lo cual ocurre de manera diferencial dependiendo del género y patologías concomitantes. Diferentes variantes de corte y empalme (splicing) del gen de la alfa sinucleína son regulados diferencialmente por distintos miRNAs. Polimorfismos en la región 3'-UTR del gen de la alfa sinucleína podrían estar relacionados con cambios que afectan la estructura secundaria del

mRNA y alterar la unión de los miRNAs y por tanto afectar la expresión del gen (116).

1.1.2 INTERLEUQUINA 6 Y SUS RECEPTORES

La interleuquina 6 (IL-6) es una glicoproteína de respuesta inmune de acción pleiotrópica, que tiene funciones importantes a nivel hepático donde induce un incremento de las proteínas de fase aguda como la PCR (proteína C reactiva), disminuye la síntesis de albúmina y transferrina, en células estromales, estimula la expresión de RANKL para la diferenciación y activación de los osteoclastos; en la médula ósea promueve la maduración de los megacariocitos y de mieloblastos, favorece la diferenciación de células T, participa en el proceso de maduración de linfocitos B (productores de inmunoglobulinas), estimula la producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular, por sus siglas en inglés), lo cual conlleva a un efecto angiogénico (117). Además de las células del sistema inmunológico, los fibroblastos, las células endoteliales, adipocitos y las células mesenquimales también producen IL-6 ante diferentes estímulos (118). En la regulación de su expresión participan los receptores TLR que favorecen la activación de vías de señalización relacionadas con NF κ B como MAPK, que a su vez afecta vías como ERK y JNK, e induce un aumento en el mRNA de la IL-6. El TNF- α y la IL-1 también aumentan la actividad transcripcional del gen que codifica para la IL-6 (117).

Por otro lado, el gen del receptor de la IL-6 (IL-6R) se encuentra en 1q21 y codifica para una proteína de 468 residuos de aminoácidos, forma una estructura multimérica que consta de la subunidad receptora y de la subunidad transductora identificada como gp130 que se expresa predominantemente en neutrófilos, monocitos, linfocitos B, entre otros tipos celulares. Sin embargo, en fibroblastos y en células endoteliales no se encuentra (118). La subunidad gp 130 se expresa en gran número de tejidos y responde tanto al receptor de membrana (vía clásica

de señalización) como a la forma soluble del receptor de IL6, mecanismo de acción que ha sido llamado trans-señalización. El complejo de unión IL-6/IL-6R activa también la vía de señalización mediada por las JNK, específicamente JAK1, (Janus kinasa), la cual favorece la dimerización de STAT3 (corresponde a un miembro de la familia de las proteínas STAT, las cuales actúan como factores de transcripción). Particularmente, STAT3 es el principal transductor de señal corriente abajo de las proteínas gp130, las cuales son subunidades del IL-6R para que se pueda translocar al núcleo y unirse al ADN y favorecer la expresión de proteínas asociadas al fenómeno proinflamatorio (119).

Algunos estudios han encontrado que polimorfismos en el promotor del gen de IL-6 presentan asociaciones positivas con consumo de alcohol y con las concentraciones de IL-6. Por otro lado, otros estudios han encontrado que las vías de IL-6/IL6R están involucradas en la patogénesis de la depresión severa y la psicosis (enfermedades concomitantes del alcoholismo), y pueden ser nuevos objetivos terapéuticos en el tratamiento de estas enfermedades psiquiátricas, particularmente el empleo de anticuerpos anti IL6 produce efectos beneficiosos en artritis reumatoide (120–122). Los niveles séricos de IL6 se han reportado alterados en consumidores de alcohol ya sea al inicio o durante la abstinencia (123). De aquí que esta vía de señalización sea interesante para la búsqueda de blancos terapéuticos del alcoholismo.

1.1.3 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) Y SUS RECEPTORES

Dentro de las citoquinas proinflamatorias está el TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α) al cual se le atribuye un papel central en la regulación de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa y por ende en la respuesta inflamatoria. Éste actúa sobre células que expresan receptores membranales de TNF- α como las células endoteliales, epiteliales y tumorales, al mismo tiempo el TNF- α se ha mostrado que en cultivo *in vitro* aumenta su síntesis por parte de células

tumorales de mama y de ovario. El TNF- α en células tumorales también tienen la función de aumentar la expresión de metaloproteinasas en otros tipos de células cancerígenas que facilitan el proceso de degradación de la matriz extracelular y así inducir la metástasis (124).

TNF- α , considerada una citoquina proinflamatoria, fue descubierta en terapias contra el cáncer, es sintetizada por macrófagos, monocitos activados, posee actividad citotóxica, actúa sobre células que expresan receptores membranales de TNF- α como las endoteliales, epiteliales y células tumorales. El gen que la codifica tiene cuatro exones y tres intrones, está localizado en el cromosoma 6 en la región 6p21, genera una proteína de 157 residuos de aminoácidos, es trimérica, análogo a la interleuquina 1. Casi todos los tipos celulares tienen receptores para TNF- α , los cuales son de dos tipos, unido a membrana y soluble, TNFR-55(tipo 1) y TNFR-75(tipo 2), respectivamente.

La presencia de TNF- α -R1 soluble en el suero puede competir e inhibir la acción de TNF- α en las células, pero, por otro lado, al unir el TNF- α en una forma disociable, puede afectar drásticamente la farmacocinética y la estabilidad de TNF- α . TNF- α causa la lisis de las células blancas y los genes activados son variados y dependen de la célula blanca, destacándose c-fos, c-jun, Mn-SOD, entre otros. Se secretan moléculas tales como IL6, GM-CSF, M-CSF en endotelio, pero no activa a las células LT. El LPS es un importante inductor de TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo*. TNF- α interactúa de una manera compleja con el sistema inmune y con el sistema vascular llevando a la liberación de citoquinas, expresión de nuevas determinantes de superficie y producción de otros mediadores, como PAF y eicosanoides (110, 111).

Una gran variedad de células es capaz de producir IL6: macrófagos, linfocitos, células endoteliales, fibroblastos, etc. activadas por TNF alfa. La principal actividad es la antimalignocitotoxicidad celular del TNF- α , especialmente en combinación con interferones (IFN), y que no puede ser obtenido solo por tratamiento con IL1. Además, la activación rápida de neutrófilos por TNF no se ve con IL1. Tanto TNF- α como IL1 son potentes inductores de IL6. Una infección o

una inflamación puede estar localmente restringida, pero la IL6 que se produce, circula por todo el cuerpo y pone en movimiento una gran variedad de reacciones. Estos resultados podrían significar que demasiado IL6 es perjudicial para el organismo(125).

Por supuesto, el TNF- α no solo induce nuevos antígenos en las células efectoras, sino también estimula la liberación de citoquinas, como IL6, IL1, GM-CSF, y una gran variedad de otras citoquinas que causan la migración de neutrófilos y otros glóbulos blancos al sitio de la inflamación o al tumor. TNF- α induce la transcripción y la activación de un gran número de genes en una gran variedad de tipos celulares. ¿Cuáles de los genes se inducen?, depende por supuesto, de la particular combinación de actuación positiva y negativa de factores de transcripción presentes en esa célula blanco. Los niveles de TNF alfa en bebedores fuertes es mayor que en abstemios al igual que en bebedores ocasionales y en general se correlaciona con la disfunción hepática, además de haberse encontrado alterada en estudios GWAS del alcoholismo (49,123,125).

1.1.4 INTERLEUQUINA 1 Y SUS RECEPTORES

IL1 es, como el TNF- α , un producto de macrófagos activados (por ejemplo, estimulado con LPS), monocitos y células dendríticas. Es muy interesante que IL1 ejerza un efecto similar al TNF- α en una amplia gama de células, aunque ambas citoquinas actúan en diferentes receptores, dos receptores para TNF- α y también dos receptores diferentes para IL1. Son 11 los miembros de esta familia con 10 distintos receptores, se conocen principalmente tres formas: alfa, beta1 y beta2. La interleuquina 1 beta es el miembro más estudiado de esta familia de proteínas, sus genes se encuentran en el cromosoma 2 en la región 2q14.1 en un agrupamiento con ocho genes constituyendo la familia de IL1 beta. Es un gen constituido por 8 exones y 7 intrones. Entre los principales efectos de IL1 esta

favorecer la producción de factores quimiotácticos estimulando la síntesis de citoquinas (IL-6, IL-8 y TNF- α) y de quimiocinas, adicionalmente es pirogénica, e induce la producción de prostaglandinas (126).

Hay dos receptores para la IL-1, los cuales difieren en tamaño y en función. IL-1R1, es una proteína transmembrana cuya función es la transducción de la señal inducida por la IL-1. Por otro lado, IL-1R2 es una glicoproteína, es 100 veces más afín por la IL-1 y actúa como regulador negativo de la actividad de la IL-1 disminuyendo su biodisponibilidad, por lo cual inhibe la señalización endógena inducida por su ligando, dado que IL-1R2 compite con IL-1R1 por la IL-1, así mismo, IL-1R2 carece del dominio citoplasmático requerido para la transducción de señales (127). Al unirse IL1 al receptor 1A media la activación de la vía de NF κ B y MAPK entre otras.

En población japonesa se han reportado SNV's en genes de IL-1 y IL-1R que se han asociado al riesgo de alcoholismo, aunque dichos hallazgos no se han replicado en población europea (128).

1.1.5 INTERLEUQUINA 12 Y SUS RECEPTORES

La interleuquina 12 es una citoquina proinflamatoria producida por células presentadoras de antígenos como macrófagos, como también por los monocitos, células dendríticas, neutrófilos etc. Su función es activar las células T helper de tipo 1 (Th1), estimular la citotoxicidad de células T y NK y estimular la producción de interferón gamma, entre otras. Junto con TNF- α , sinérgicamente induce la producción de interferón gamma.

La IL-12 es una proteína heterodimérica codificada por dos genes IL-12A (p35) e IL-12B (p40) constituyendo una forma activa llamada p70. Se une a los receptores IL-12RB1 e IL-12RB2 que se encuentran principalmente en las células T y NK, estimulan el crecimiento de las células Th1 y NK, mientras que inhiben las respuestas de las células Th2. Desencadenando una cascada de fosforilación

por las quinasas Tyk2 y Jak2 activando factores de transcripción como STAT4. La IL-12 aumenta la citotoxicidad de los linfocitos T y las células NK, al menos en parte mediante el aumento de la secreción de IFN- γ y TNF- α , y la inhibición de la producción de IL-4. En consecuencia, IL-12 favorece las respuestas de tipo Th1 sobre la inflamación de tipo Th2 e IgE.

Existe una relación entre el consumo de alcohol y el aumento de los niveles séricos de interleuquina-12, lo que sugiere que esta citoquina puede desempeñar un papel importante en la inducción de las anomalías inmunológicas encontradas en el alcoholismo crónico, independientemente de si la enfermedad hepática alcohólica está presente o no (129,130).

1.1.6 INTERFERONES Y SUS RECEPTORES

Son citoquinas que cumplen una importante función en la comunicación celular, en la respuesta inmune por la presencia de agentes patógenos. Inicialmente recibieron esa denominación, pues participaban en la erradicación o interferencia de la infección viral, sobre todo útil para las células vecinas. Hoy en día se sabe que participan en la activación de células tipo natural killer y macrófagos, incrementado la presentación de antígenos. Se clasifican en tres grandes grupos: I (IFN α (leucocitario)/ β (fibroblástico)), II (IFN γ (linfocitos T y células NK)) y III (IFN λ (células dendríticas mieloides)) (131,132).

Los interferones alfa (IFN α) en humanos son polipéptidos codificados por 13 genes distintos que generan proteínas con alrededor de 160 residuos de aminoácidos, no glicosiladas con peso molecular comprendido entre 16.000-23.000 Daltons, producidas por monocitos, leucocitos, linfocitos B. Desempeñan un papel importante en la respuesta antiviral, a algunos otros tipos de

microorganismos y compuestos sintéticos, además de actuar como sustancias inmunomoduladores y antiproliferadores.

Los interferones gamma (IFN γ) están codificados por el gen *IFNG* que produce en promedio una glicoproteína de 160 residuos de aminoácidos con peso molecular comprendido entre 16 y 23 kDa, solubles y que actúan en forma dimérica. Son producidos por los linfocitos T CD4⁺, los NK y NKT con la función de activar las células presentadoras de antígenos como macrófagos y células dendríticas, además de funcionar como estimuladores e inmunomoduladores del sistema inmune. Además de actuar como activador de iNOS e inducir la síntesis de Ig y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Los receptores de los IFN de tipo I (IFN $\alpha\beta$ R) se expresan de manera ubicua. Los IFN γ actúan uniéndose a dos tipos de receptores IFNGR1 e IFNGR2 (tipo II) activando la vía de JAK-STAT.

Es conocido que el consumo excesivo de alcohol finalmente inhibe la respuesta inmune aumentando la susceptibilidad a infecciones. Durante la fase inicial del alcoholismo se activa la vía del interferón, el IFN α aumenta la sensibilidad de células hepáticas al TNF- α y la activación mediada por el etanol con aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12(133).

1.1.7 INOS

La enzima óxido nítrico sintasa (EC 1.14.13.39) es encargada de sintetizar óxido nítrico (NO) convirtiendo arginina en citrulina con participación de NADPH y oxígeno molecular como cosustratos y de las coenzimas flavin-mononucleótido (FMN) y (6R-) 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH₄). Hay tres familias de esta enzima, dos constitutivas (NOS1-neuronal y NOS3-endotelial) presentes principalmente en citoplasma de este tipo de células y una inducible (iNOS o NOS2) activa en macrófagos, condrocitos y hepatocitos, asociada a membrana

celular. Todas ellas actúan como proteínas homodiméricas y están asociadas a calmodulina (134).

iNOS es de activación mediada por NFκB en la respuesta inflamatoria e inmune, entre otros procesos. El NO es la molécula de señalización más pequeña constituyéndose en un importante mediador intra e intercelular que estimula la formación de especies reactivas de nitrógeno y la toxicidad celular. Alteraciones en la concentración de NO se ha evidenciado en numerosas patologías reproductivas, infecciosas, hipertensión, diabetes tipo 2, hipoxia, cáncer etc. iNOS en macrófagos activa la producción de NO, compuesto generador de citotoxicidad causando daños a los sistemas contenedores de grupo hemo en las células, particularmente a las mitocondriales. Además, causa daños al proceso de replicación del ADN. Células no-inmunes pueden producir NOS, como las células tumorales que lisan células y los hepatocitos inducidos pueden utilizar NO para matar los esporozoitos de la malaria (134).

El alcoholismo no es la excepción e iNOS se activa y afecta particularmente la permeabilidad intestinal con la alteración de proteínas de adhesión y el daño oxidativo; por ello el empleo de inhibidores de esta enzima es un blanco terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad. El inhibidor enzimático llamado clorhidrato de L-N⁶- (1-iminoetil) lisina (L-NIL) es activo contra todas las isoformas de NOS, y ha sido el más eficaz para prevenir su manifestación de alcoholismo (135).

1.1.8 MIF (FACTOR INHIBIDOR DE MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS) Y SUS RECEPTORES

En humanos hay un solo gen de MIF ubicado en la posición 22q11.2 codificando para una proteína pleiotrópica trimérica reguladora de la inmunidad tanto innata como adquirida. Como enzima tiene actividad fenilpiruvato tautomerasa y

dopacromo tautomerasa (*in vitro*), pero se desconoce el sustrato fisiológico. No está claro si la actividad de la tautomerasa tiene alguna relevancia fisiológica y si es importante para la actividad sobre las citoquinas. Se expresa constitutivamente en células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B y mastocitos, de igual forma se expresa en células no inmunes como: epiteliales y endocrinas(136). El MIF circulante se une a CD74, CXC chemokine receptor (CXCR)2, CXCR4 y CXCR7. Los antígenos bacterianos estimulan los leucocitos para liberar MIF al torrente sanguíneo y este se une a CD74 en otras células del sistema inmune desencadenando una respuesta inmune aguda. Por otro lado, participa en procesos de inhibición de la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides. MIF directa o indirectamente promueve la expresión o producción de numerosas moléculas proinflamatorias como citoquinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de matriz extracelular, óxido nítrico y productos de la vía del ácido araquidónico. Polimorfismos funcionales en la región promotora del gen de MIF han sido estudiados y relacionados con cambios en la susceptibilidad y severidad en diversas patologías infecciosas y no infecciosas como las autoinmunes: asma, artritis inflamatoria juvenil, artritis reumatoide, escleroderma, lupus eritematoso sistémico etc. Particularmente, el SNV G/C en la posición -173 (rs755622) y la repetición del tetranucleotido CATT en -794 han sido asociados con alteraciones en la actividad transcripcional de este gen, en donde un número mayor de repeticiones se correlacionan con una mayor actividad transcripcional (137).

En grandes bebedores de alcohol se observa un aumento en la expresión de MIF. El ibudilast es un medicamento inhibidor dual de las fosfodiesterasas 4 y 10 y de MIF que exhibe buenos efectos en pacientes con problemas de consumo de alcohol y en modelos animales de alcoholismo. Los resultados obtenidos en los últimos años recomiendan evaluar a MIF como biomarcador para predecir la respuesta psicoterapéutica y farmacológica en pacientes con problemas de consumo de alcohol, buen candidato a diana terapéutica (138).

1.1.9 NFκB

Es un factor de transcripción ubicuo en el organismo de mamíferos. Tiene un gran número de genes blanco y puede afectar procesos tales como el aprendizaje, la memoria, la adicción, supervivencia celular, hematopoyesis, depresión, inflamación, respuesta inmune etc. Está formado por cinco subunidades que actúan en forma dimérica. Estas subunidades pueden ser: RelA(p65), RelB, c-Rel, NFκB1(p50) y p52 formando más de 15 formas diméricas (homo y heterodímeros) con diversidad de funciones. Generalmente los dímeros RelA/p50 actúan como activadores transcripcionales, mientras el dímero p50/p50 actúa como un represor transcripcional (139). El gen NFκB1 se ubica en 4q24, una amplia región de cromosoma 4 que se ha relacionado con la dependencia al alcohol y son múltiples los genes que se han asociado a esta patología y que se ubican en esta región. En este gen particularmente se han encontrado 12 SNV's tanto en región promotora como en codificante asociados al alcoholismo en estudios familiares en los Estados Unidos de América, teniendo la edad de inicio del consumo como un factor ambiental de importancia para el desarrollo de la patología, es así que las variaciones en NFκB1 parece afectar el riesgo de alcoholismo, contribuyendo particularmente a un inicio más temprano de la enfermedad (140). NFκB es activado por TLR4, TNFR, IL-1R que permiten la fosforilación de IKK (inhibidor de NFκB) constituyendo lo que se llama la vía clásica o canónica de activación. En la vía no canónica la quinasa inductora de NFκB (NIK) activa IKKα, que a su vez fosforila a p100, la proteína precursora de p52. Luego, p100 se procesa en heterodímeros p52/RelB. Después de liberarse del complejo IκB, los dímeros NFκB se trasladan al núcleo donde se unen a secuencias específicas de ADN en la región promotora de una amplia gama de más de 200 genes (141).

Elevada concentración de alcohol en sangre incrementa la actividad de NFκB y de forma diferencial dependiendo del sexo de los individuos. NFκB contribuye a la

conducta de búsqueda de alcohol estimulando la expresión de genes mediadores de inflamación. Hay una relación entre el consumo de alcohol, la producción de LPS y el incremento de citoquinas. El estrés puede ser la principal causa que lleve a la búsqueda de sustancias psicoactivas en nuevos consumidores o a la recaída en adictos en abstinencia (54).

Son diversos los parámetros para tener en cuenta cuando un agente psicoactivo afecta la expresión del factor NFkB, entre otros esta la clase de psicoactivo, la frecuencia de consumo, la dosis etc., los cuales podrían ser críticos para modificar el papel de NFkB en la recompensa, promoción de la neurogénesis para inducir finalmente la toxicidad. Aunque el conocimiento de la causalidad entre la activación de NFkB y los efectos en los genes blancos que median el comportamiento son escasos (54).

1.1.10 HMGB1

La HMGB1 (High mobility group box 1) es una proteína de 215 residuos de aminoácidos que tiene funciones tanto en el núcleo celular (guardián del genoma), citoplasma (autofagia) y forma secretada (media respuestas fisiológicas específicas). La producen células inmunes como macrófagos, monocitos, células dendríticas actuando como mediador de la secreción de citoquinas proinflamatorias. El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma 13, en la posición 13q12.3 consta de 9 exones que por corte y empalme (splicing alternativo) da como resultado múltiples variantes de transcripción que codifican proteínas pertenecientes a la superfamilia de cajas de grupos de alta movilidad. La proteína B1 del grupo de alta movilidad es de unión al ADN nuclear, tipo no histona, regula la transcripción y participa en la organización del ADN, interactúa como chaperona con los nucleosomas “aflojando” el ADN y permitiendo la remodelación de la cromatina, además de ser esencial en los procesos de

replicación, recombinación V (D) J, reparación del ADN y estabilidad del genoma. Por otro lado, esta proteína juega un importante papel en varios procesos celulares, incluida la inflamación, la diferenciación celular, la migración de células tumorales y participa en la coordinación e integración de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. En el citoplasma funciona como sensor y/o acompañante de ácidos nucleicos inmunogénicos que implican la activación de respuestas inmunitarias mediadas por TLR9 y en la autofagia(142).

Las proteínas HMGB1 pueden tener un papel potenciador en la reparación por escisión de nucleótidos (NER), además de estar involucrada en las vías de reparación de malos apareamientos (MMR), reparación de escisión de base (BER), reparación de roturas de doble cadena, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Mejora la unión de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), como SREBF1, a sus secuencias de ADN afines y aumenta sus actividades transcripcionales(143).

A nivel extracelular interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria. La HGMB1 completamente reducida en asociación con CXCL12 media el reclutamiento de células inflamatorias durante la fase inicial de la lesión tisular; el complejo CXCL12/HMGB1 desencadena la homodimerización de CXCR4. Induce la migración de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos y parece regular las funciones adhesivas y migratorias de los neutrófilos. Además, posee actividad pro-angiogénica, puede estar involucrada en la activación plaquetaria, media la señalización del crecimiento neuronal y está involucrada en la autofagia mediada por estrés oxidativo. Los estudios en el cultivo de cortes de cerebro del hipocampo encontraron que el etanol aumentaba los complejos HMGB1/IL-1 β en los medios. Estos estudios sugieren un nuevo mecanismo neuroinmune en la patología del alcoholismo(144).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La alcohol-dependencia es un trastorno de carácter multifactorial. Teniendo en cuenta que los factores genéticos explican alrededor del 50 % de la etiología del alcoholismo y éstos poseen una gran heterogeneidad y uno de los factores importantes para tener en cuenta es la etnicidad, nos realizamos la siguiente pregunta: ¿Al realizar un estudio de marcadores moleculares de genes candidatos de la vía de respuesta inflamatoria en una muestra de individuos con consumo problemático de alcohol colombianos, encontraremos diferencias con relación al grupo control y éstos marcadores podrían ser candidatos para dianas terapéuticas?

1.7 Hipótesis

Variantes génicas que afecten estructuralmente o su expresión o estado de metilación de genes candidatos involucrados en el proceso inflamatorio en grupos de individuos con uso problemático del alcohol y controles de origen étnico colombiano presentan diferencias que podrán ser exploradas como dianas terapéuticas para el tratamiento de esta patología.

1.8 OBJETIVO GENERAL

Generar firmas moleculares a partir de perfiles génicos, de expresión y patrones de metilación de genes candidatos de respuesta inflamatoria implicados en la dependencia alcohólica, explorando la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas.

1.9 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la asociación de SNV`s en región promotora de genes candidatos implicados en respuesta inflamatoria con la susceptibilidad al uso problemático del alcohol.
2. Determinar sí hay diferencia de expresión génica de genes candidatos de respuesta inflamatoria relacionados con el uso problemático del alcohol cuando se comparan muestras de controles y casos.
3. Determinar el estado de metilación de islas CpG de promotores de genes candidatos de respuesta inflamatoria relacionados con el uso problemático del alcohol comparando controles y casos.
4. Integrando los datos génicos, de expresión, de estado de metilación, identificar y caracterizar biomarcadores, posibles dianas terapéuticas del alcoholismo

Para efectos del desarrollo de este escrito iremos desarrollando cada uno de los objetivos específicos describiendo: introducción, metodología, resultados y discusión.

2 Capítulo 2

2.1 Objetivo 1:

Determinar la asociación de SNV`s en la región promotora de genes candidatos implicados en respuesta inflamatoria con la susceptibilidad al uso problemático del alcohol.

2.1.1 Introducción:

El análisis de variantes de nucleótido simple (SNV) en el ADN permite identificar alelos que confieren susceptibilidad a desarrollar una patología. La alcohol-dependencia al ser una enfermedad multifactorial y poligénica, tradicionalmente sus estudios genéticos se han centrado en determinación de SNV`s de manera aislada de distintas vías, lo que se traduce en difíciles asociaciones reales a lo que se le suma su variabilidad interétnica (poblacional) y el factor umbral. El objetivo de esta primera parte del trabajo de investigación fue la determinación de SNV`s de genes relacionados con la alcohol-dependencia de una vía de respuesta como es la inflamatoria en una población universitaria residente en Bogotá. En el presente trabajo se incluyeron 11 genes candidatos relacionados con el proceso de respuesta inflamatoria, además de las 28 variantes de un solo nucleótido (SNV`s) se analizó una variante de longitud, un STR. Estos polimorfismos génicos se encuentran en la región promotora de los genes seleccionados y se pretende relacionar estas características en el desarrollo de

los siguientes objetivos, es decir con su tasa de transcripción, sus niveles de proteína y el estado de metilación de un segmento del promotor, con el fin de proponer posibles blancos terapéuticos.

La síntesis y secreción de citoquinas depende de sus propias regiones promotoras génicas. Para diferentes citoquinas estas regiones son variables y los polimorfismos allí presentes podrían tener un gran impacto en su expresión. La variabilidad y asociación con la patología dependerá de la etnicidad de la muestra, de la definición clara y adecuada del fenotipo y métodos experimentales y estadísticos usados (145).

2.1.2 Metodología:

2.1.2.1 DEFINICION DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio hombres y mujeres mayores de 18 años nacidos en Colombia, residentes en la ciudad de Bogotá, que tenían algún vínculo con la Universidad Nacional de Colombia, ya sea como estudiantes, docentes o administrativos y aceptaron participar mediante la firma de consentimiento informado (ver anexo 1). Inicialmente se realizó una convocatoria a través de redes sociales de la Universidad Nacional de Colombia en donde se detallaba el objetivo del estudio. A todos los individuos incluidos en el estudio se les aplicó el cuestionario AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test, ver anexo 2) como instrumento de clasificación de severidad de la alcohol-dependencia validado para Colombia por Campo y Ospina (146,147). La selección de la muestra de individuos se hizo por conveniencia, el grupo control se seleccionó teniendo en cuenta que fueran personas del mismo sexo y edades similares que los probando y que obtuvieron puntajes AUDIT menores de 7, mientras la selección de individuos con uso problemático del alcohol se realizó teniendo en cuenta los

siguientes criterios: individuos cuyo primer problema con sustancias adictivas fuera el alcohol y que obtuvieron puntajes AUDIT superiores a 7. Por otro lado, a todos, tanto controles como casos se les realizó una entrevista semiestructurada, preparada basados en Scoppeta, 2011 (148) y Silla, 2009 (149) (ver anexo 3) con el objetivo de obtener mayor información sobre hábitos, frecuencia y cantidad de consumo, condición médica, historia personal y familiar y de esta forma poder identificar esos fenotipos característicos y definir claramente los grupos controles y casos. Se excluyeron voluntarios que reportaran infecciones, alergias, enfermedades hepática y psiquiátrica diagnosticadas. Igualmente se excluyeron personas que estuvieran bajo algún esquema de tratamiento farmacológico. El presente estudio fue aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

2.1.2.2 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de corte transversal, tipo casos y controles con un muestreo no probabilístico (no aleatorio) por conveniencia.

2.1.2.3 INSTRUMENTO DE CLASIFICACIÓN

El cuestionario AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test, ver anexo 2) fue desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un método simple de tamizado del consumo excesivo de alcohol y como un apoyo en la evaluación breve. Este Comprende 10 preguntas que indagan sobre el consumo reciente, síntomas de la dependencia y problemas relacionados con el alcohol (ver tabla 2-1). El AUDIT es una prueba de tamizado diseñado específicamente para uso internacional; identifica el consumo de riesgo y perjudicial de alcohol, así

como una posible dependencia. Es Breve, rápido, y flexible y por ello fue seleccionado para clasificar la población de estudio (8,150).

Tabla 2-1 Dominios y Contenidos del AUDIT. (Tomado de: Monteiro M. Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas)(8).

DOMINIOS	NÚMERO DE LA PREGUNTA	CONTENIDO DE LA PREGUNTA
Consumo de riesgo de alcohol	1.	Frecuencia de consumo
	2.	Cantidad típica
	3.	Frecuencia del consumo elevado
Síntomas de dependencia	4.	Pérdida del control sobre el consumo
	5.	Aumento de la relevancia del consumo
	6.	Consumo matutino
Consumo perjudicial de alcohol	7.	Sentimiento de culpa tras el consumo
	8.	Lagunas mentales
	9.	Lesiones relacionadas con el alcohol
	10.	Otros se preocupan por el consumo

Cada una de las preguntas tiene una serie de respuestas a elegir y cada respuesta tiene una escala de puntuación de 0–4. La clasificación de cada individuo se realizó con la siguiente escala sobre el puntaje total:

0-7: No tiene problemas relacionados con el alcohol

8-12: Consumo de riesgo

13-19: Consumo perjudicial

20-40: Problemas fisicoquímicos con la bebida y/o posible dependencia alcohólica (Ver_anexo 2).

Un aspecto muy importante para definir más claramente el fenotipo de interés fue calcular de forma adecuada los gramos de alcohol consumidos por los

participantes en el estudio. Sin embargo, esta medición resulta ser muy compleja por la diversidad de bebidas alcohólicas existentes, sus diferentes grados de alcohol y las diversas formas de presentación y de consumo por parte de las participantes. Y cada una estas características pueden asociarse a diferentes efectos en la salud humana y no tenerlas en cuenta podría ser un factor de confusión. No es tan importante el volumen de bebidas alcohólicas consumidas por los participantes, es necesario traducir esos datos en gramos de etanol absoluto consumidos y para ello recurrimos a la ecuación 2-1 (151):

$$\text{Gramos de alcohol} = \frac{\text{volumen (mL)} \times \text{graduación} \times 0,8}{100}$$

Ecuación 2-1 Cálculo de gramos de etanol absoluto consumidos por participantes en el estudio por tipo de bebida alcohólica consumida.

2.1.2.4 ETAPA EXPERIMENTAL

Se tomaron muestras de sangre periférica por venopunción en tubos Vacutainer-EDTA y se colocaron en hielo de forma inmediata. De tres a cinco gotas de sangre se depositaron en tarjetas tipo FTA debidamente marcadas con el nombre del probando y un código asignado para posteriores ensayos y como reserva en caso de necesitar confirmar algunos resultados (152). La muestra restante se dividió en dos, una parte para realizar la extracción de ADN y la otra para extracción de ARN total y obtención del plasma.

2.1.2.5 ESTUDIO DE SNV's

La extracción del ADN de las muestras de sangre periférica se realizó según protocolo de aislamiento de ADN genómico por salting out (153) y modificaciones

propias que describiremos a continuación: Se homogeneizó el tubo con la muestra, por inversión varias veces. Se agregó en un tubo eppendorf 900 μL de buffer de lisis de glóbulos rojos (155mM NH_4Cl , 10mM NaHCO_3 , 0.1mM EDTA pH 7.4-8.0). Luego se adiciono 400 μL de la muestra sanguínea. Se tapó el tubo y mezcló por inversión suavemente 5-6 veces. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante en el recipiente de descarte con hipoclorito diluido y se dejó un volumen de aproximadamente 20 μL con el pellet. Le siguieron tres lavados con 900 μL de buffer de lisis de glóbulos rojos cada vez. Después del último lavado, se resuspendió muy bien el pellet con ayuda del vórtex por 30 segundos. Se adicionó 500 μL de buffer de lisis de glóbulos blancos (10mM Tris-Cl pH 8.0, 400mM NaCl, 2mM EDTA pH 8.2, 0.2% SDS) y mezcló por inversión. Luego se adicionó 500 μL de NaCl 5M y mezcló con vórtex por 30 segundos e incubo 5 minutos en hielo. Le siguió una centrifugación a 14.000 rpm por 10 minutos (precipitación de proteínas). Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5ml que contenía 500 μL de isopropanol. Se mezcló bien por inversión varias veces y observó la aparición de una mota blanca (ADN). A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. El ADN se observó como un pellet blanco. Se descartó el sobrenadante y lavó ese pellet con 1ml de etanol al 70%. Se mezcló por inversión varias veces y luego se centrifugó a 14.000 rpm por dos minutos. Se descartó el etanol cuidadosamente, evitando desprender el pellet. Se secaron los restos de etanol en Speed Vac o baño seco por 15 minutos a temperatura “alta” (aproximadamente 55° C). El pellet se resuspendió con 100 μL de buffer TE 1X (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.2) e incubó a 55°C por 1 hora o se dejó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) toda la noche. Se almaceno el ADN resuspendido a 4°C hasta el momento de la cuantificación por espectrofotometría con nanodrop y el montaje de la PCR u otro ensayo que requiriera ADN. Para periodos más extensos de almacenamiento se hizo a -80 °C. Para cuantificar el ADN obtenido se colocó un μL del extracto en el punto de medición del nanodrop TM (2000 de

thermoscientific) y se anotó el valor obtenido en cada una de las lecturas y las relaciones 260/280 nm como criterio de pureza se consideraron valores $> \text{ó} = 1,8$, catalogándolas como puras, bajas concentraciones de proteínas y/o solventes orgánicos. La relación 260/230 nm como parámetro para medir contaminación cuando su valor es menor a 1,8 indica presencia de solventes orgánicos o agentes caotrópicos empleados en el proceso de extracción y/o purificación. Previamente se blanqueó el equipo con TE 1X o agua según el solvente en que se resuspendió el ADN. La mayoría de las muestras cumplieron los criterios anteriormente definidos y las que no, se sometieron a nueva extracción hasta cumplir con las condiciones establecidas.

Teniendo en cuentas las lecturas anteriores, si estaban muy concentradas, se preparó una dilución de trabajo (pre-PCR de volumen final de 20 μl). O se tomó uno o dos μL directamente de la resuspensión del ADN. Esta dilución se usó para el montaje de la PCR.

Las reacciones de PCR se estandarizaron y montaron de acuerdo con las recomendaciones de las guías prácticas sobre montaje de PCR con el fin de evitar contaminaciones y productos erróneos de amplificación(154). En un tubo eppendorf de 1.5 ml, se preparó una mezcla (máster mix) para el número total de muestras, incluyendo los controles y de una a cinco muestras adicionales (dependiendo de la cantidad de tubos requeridos) para controlar el error de pipeteo. Luego, los reactivos se adicionaron en el orden descrito en la tabla 2-2. Todos los tubos con reactivos fueron descongelados, homogenizados previamente a su utilización.

Tabla 2-2 Montaje de la mezcla de PCR convencional para la amplificación de segmentos de ADN que contenían las variantes seleccionadas de SNV's.

Reactivo	[inicial] stock	[final] Tubo PCR
Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25mM	1.5 mM

DNTPs	10mM	200uM
Primer's	10mM	0.1 uM
AGUA	_____	_____
Taq pol.	5 U/μl	0,2 unidades
ADN** (se adiciona luego)	Variable	X
Volumen Final	XXX	25 μl

Se tapó el tubo y mezcló con vórtex entre 5 y 10 segundos. Se dispense en cada tubo de PCR la correspondiente cantidad calculada. De acuerdo con la relación: (Volumen total del máster mix- volumen de muestras adicionales) / número de muestras.

Luego se adiciono el ADN, de 50 a 100 ng totales a cada tubo de PCR. Se realizó un vortex y un spin en centrifuga antes de colocar los tubos en el termociclador. Se llevaron los tubos al termociclador de punto final modelo T100™, marca Bio-rad, asegurándose que quedaran bien tapados. Se seleccionó el programa de corrido en los programas de termociclaje. La verificación de la amplificación se realizó en geles de agarosa entre 2 y 3%, teñidos con SYBR-safe y se realizó el respectivo registro fotográfico.

Para la selección de los genes, se buscó en la literatura las moléculas descritas más frecuentemente relacionadas con el fenómeno de inflamación y alcoholismo, luego se buscó en las bases de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) la secuencia de estos genes. La región promotora fue identificada utilizando la base de datos Eukaryotic Promoter Database (EPD) y el mismo GenBank, se identificó las variantes de un solo nucleótido (SNV's) dentro de esta secuencia. Se seleccionó un segmento de la región promotora, que en investigaciones previas había mostrado la presencia de polimorfismos asociados

con fenotipos de adicciones y/o alto consumo de alcohol y/o algunas enfermedades psiquiátricas (de presentación dual con el alcoholismo). Luego, de haber identificado los polimorfismos se diseñaron los iniciadores o primer's utilizando las herramientas de Primer'3 y/o Primer-BLAST(155,156)(Ver tabla 2-3). Se solicitó su síntesis y purificación en un laboratorio externo (Macrogen-Korea).

Para la reacción de PCR fueron utilizadas las siguientes condiciones de termociclado: 1) Un ciclo de desnaturalización inicial (94°C, 5 minutos) 2) 30 ciclos con: Desnaturalización (94°C, 15 segundos), hibridación (específica para cada variante que se determinó pre-experimentalmente mediante gradientes de temperatura, ver tabla 2-3, 30 segundos) y extensión (68°C, 60 segundos) 3) Un ciclo de extensión final (68°C, 5 minutos). Un ciclo final de conservación a 4 °C. Los amplificadores se conservaron a -20°C. En el proceso de estandarización de los protocolos se realizó con un gradiente de temperatura para escoger la temperatura de hibridación óptima de cada par de primer's.

Tabla 2-3 Características de los primer's empleados para la PCR convencional en la determinación de variantes genéticas (SNV's y STR's) seleccionadas.

Gen	Primer's	Secuencia 5'--3'	Longitud del primer	Temperatura de hibridación (°C)	Longitud del Amplicón (pb)
IL6R	Forward	CACAGCGTAATCCCGTTCAC	20	53	517
	Reverse	AGAGGCGGACAGGCTAATG	19		
iNOS2	Forward	CCCAGATGCTGAAAGTGAGG	20	55	495
	Reverse	CAGTCAAACCAGGAAGAGACCT	22		
IFNGR1	Forward	GTCAGGCTCCAAGACAACCA	20	55	696
	Reverse	GAGAAAGGCAACCGACGAG	19		
IFNAR1	Forward	GGTGTGTGTGTCAGAAGAGGC	21	55	152

	Reverse	GCAGATCCCACCAGTTACATG	21		
IL12RB1	Forward	AGAACCCCCTAGAACCCCTGAC	21	55	415
	Reverse	CCCACAGCTCTCCACACATAC	21		
HMGB1	Forward	AGCTCTGCTTTCCCGTAGC	19	55	263
	Reverse	AGCCTCCTCACTCTCTCCG	19		
MIF	Forward	CCAAGTGGAGAACAGGTTGG	20	58	281
	Reverse	GCAGAAGGACCAGGAGACC	19		
RELA	Forward	TGACATCACCAAACCTCCGCC	20	56,8	348
	Reverse	TGCACTACAGACGAGCCATT	20		
TNFR1	Forward	AACAAATCCTTACAGGAACCC CA	23	55	571
	Reverse	GGGTGACAGTTGAGGGTTGA	20		
α-SNCA SNV	Forward	CCGCTTGTTTTAGACGGCTG	20	51	561
	Reverse	GTCACGAGCACTCTTGTGGA	20		
α-SCNA STR- Rep1	Forward	CCTGGCATATTTGATTGCAA	20	57	269 (variable)
	Reverse	GACTGGCCCAAGATTAACCA	20		
NFKB1	Forward	GCAGCAGCCTTGAGTTTTCA	20	58,4	599
	Reverse	ATGGCCCCACTTAGATGCAA	20		

Para visualizar los productos de amplificación se empleó una cámara de electroforesis horizontal pequeña para la cual se requirió preparar 30 mL de agarosa entre 2% y 3%. La agarosa se preparó en buffer TBE 1X (Tris-base 10.80 g, ácido bórico 5.5 g, EDTA 0.5 M, pH 8.0 4 mL y agua hasta completar un litro) o TAE 1X (Tris-base 4.84g; ácido acético glacial, 1.14 mL; EDTA 0.5 M, pH 8.0, 2.0 mL y agua hasta completar un litro). La agarosa se fundió utilizando horno microondas, se dejó enfriar unos instantes y se depositó en la cámara, sin olvidar el agente intercalante (Syber Safe) un uL, barreras laterales (cuñas) y la peinilla. Se dejó solidificar aproximadamente 20 minutos. Se retiró la peinilla y cuñas. Se cubrió el gel con el mismo buffer que se utilizó para preparar la agarosa, es decir TBE 1X o TAE 1X.

Se preparó 3 microlitros de la muestra de amplificado con 3 microlitros de buffer de carga 6X (0,03% de bromofenol azul, un 0,03% de xileno cianol, 60 mM de

EDTA, pH 7,6 y un 60% de glicerol en agua grado biología molecular) y se sembró en los pozos del gel, siempre se incluyó el control negativo y el marcador de tamaño molecular. Una vez sembradas todas las muestras se conectó la cámara a la fuente de poder y corrió a 90 voltios por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se detuvo el corrido y se observó el gel en el transiluminador UV y se tomaron las respectivas fotografías.

2.1.2.6 ESTUDIO DEL STR-rep-1

Para el caso de la variante genética de longitud del gen SNCA rep-1, las condiciones de PCR convencional fueron: 2 μ L del ADN, 2,5 μ L buffer de reacción 10x; 0,5 μ L de primer forward 10 mM (fluoro marcado con 5´Fam) y 0,5 μ L de primer reverse de concentración 10 mM, taq polimerasa 0,125 μ L (5U/uL) y 18,375 μ L de agua para un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de termociclado fueron: Hot start a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 49.9°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y una extensión final de 7 minutos para concluir con 4°C infinito. Luego se tomaron 1,5 μ L del amplificado de ADN y se montó una electroforesis capilar, la cual permitió una la visualización de este polimorfismo (Rep-1) y los diferentes alelos que éste presentó. Se empleó 0.5 uL de ROX-500 como marcador de tamaño molecular. Para la electroforesis capilar se utilizó el equipo ABI PRISM 310 con previo calentamiento a 60°C y la utilización del polímero de acrilamida (POP-4) junto con el buffer Genetic analyzer 1X marcas registradas. Para identificar los diferentes alelos, es decir genotipificar, se utilizó el software Gene Marker Versión 2.6. Adicionalmente se determinó la secuencia de nucleótidos de algunos de los productos de amplificación utilizando el ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), servicio

prestado por la unidad de secuenciación de ácidos nucleicos del instituto de genética de la universidad nacional de Colombia..

2.1.2.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

En el análisis estadístico las variables continuas se expresaron como el promedio +/- la desviación estándar, mientras las variables categóricas se expresaron en porcentaje. Para los SNV's se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas por conteo directo y se expresó también en porcentaje por grupo. Se empleó la prueba de Chi cuadrado para comparar las variables categóricas y evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg. En este caso la significación estadística se estimó mediante la prueba exacta de Fisher y cuando las frecuencias eran muy bajas se empleó la corrección de Yates. Se estimaron los odds ratio (OD) e intervalos de confianza (IC) del 95 % para determinar la asociación de cada polimorfismo con la alcohol-dependencia tomando como referencia el genotipo homocigoto de mayor frecuencia. Además, se analizaron modelos de herencia, desequilibrio de ligamiento, estudio de haplotipos, modelos de epistasia y redes de genes. Para realizar estas estimaciones se emplearon las siguientes herramientas: programa estadístico SPSS de IBM para Windows versión 23 (157), programa de análisis genético GENALEX 6 (158), programa SNPStats (159), el programa MDR versión 3.0.2 (160) y el software IMP (Integrative Multi-species Prediction)(161). Para todos los análisis estadísticos se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.2 RESULTADOS

En la fase final de este estudio participaron 139 individuos, 73 se clasificaron como controles y 66 como individuos con consumo problemático de alcohol (Ver

tabla 2-4). De los controles, 39 eran mujeres y 34 hombres y en el grupo de alcohol-dependientes, 26 eran mujeres y 40 hombres. El rango de edad en ambos grupos fue similar con sujetos con edades comprendidas entre 18 y 61 años y un promedio de 27,2 y 29,7 años para controles e individuos con uso problemático del alcohol, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Del número total de individuos tanto con consumo problemático de alcohol como controles, la mayoría se encontraban en el rango etario comprendido entre 18-40 años, constituyéndose en más del 94 % de los participantes del estudio. Tanto en el grupo control como de consumo problemático, la edad de inicio de consumo de bebidas alcohólicas en más del 80 % de los participantes fue antes de los 18 años. El nivel de escolaridad en ambos grupos mayoritariamente está compuesto por estudiantes universitarios y profesionales, estos últimos pertenecientes en mayor proporción al grupo control, mientras en el grupo de consumo problemático de alcohol predominan los estudiantes universitarios de pregrado, más del 50%. Al ser tomada esta muestra en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, más de la mitad de los participantes corresponde a estudiantes universitarios de pregrado seguido por profesionales que estaban vinculados a la universidad como estudiantes de posgrado, empleados o contratistas y una mínima porción de bachilleres y técnicos, estos últimos vinculados mayoritariamente como empleados.

Tabla 2-4 Características sociodemográficas de los participantes en el estudio

Parámetro		Consumo problemático de Alcohol n (%)	Controles n (%)	Consumo problemático de Alcohol vs controles (p Valor)
Edad: media \pm SD (años)		29,7 \pm 10,4	27,2 \pm 7,6	0,060 [#]
Rango(años)		18-61	18-61	
Sexo	Hombres	40 (61)	34 (47)	0,126
	Mujeres	26 (39)	39 (53)	
Puntaje AUDIT				

Rango 0-7	0 (0)	73 (100)	0,000*
Rango > 7	66 (100)	0 (0)	
Consumo de alcohol (g, gramos)	309,4±113,5	65,5±56,2	0,000*
Edad de inicio de consumo de alcohol (años)			
<18	54(82)	59(81)	0,482
>18	12(18)	9(12)	
Cinco individuos control jamás han consumido bebidas alcohólicas			
Familiares con problemas de consumo			
Sí	14(21)	28(38)	0,000*
No	5(8)	25(34)	
No sabe/No responde	47(71)	20(28)	
Consumo de otras sustancias psicoactivas			
Sí	38(58)	15(21)	0,000*
No	7(11)	35(48)	
No sabe/No responde	21(31)	23(31)	
Estrato socioeconómico			
Bajo	12(18)	9(12)	0,166
Medio	16(24)	30(41)	
Alto	8(12)	7(10)	
No sabe/No responde	30(46)	27(37)	

*Diferencias estadísticamente significativas

*Test Exacto de Fischer $p < 0,005$

Análisis de varianza $p < 0,005$

Los 73 individuos del grupo control tuvieron un puntaje AUDIT menor de 7, mientras los 66 individuos con consumo problemático de alcohol fueron incluidos en este grupo de acuerdo con el puntaje obtenido en el cuestionario AUDIT, mayor a 7. El 12,1% obtuvo un puntaje comprendido entre 8-12, el 34,8% puntajes de 13-19 y un 53,0% un puntaje entre 20-40, es decir que más de la mitad de los casos correspondían a personas que se podrían catalogar con posible dependencia alcohólica. Se tomó la decisión de incluir en el grupo de casos a todos los puntajes mayores de siete, pues con solo puntajes mayores de

19 la muestra se reducía considerablemente, por tanto, nuestros casos corresponden como mínimo a individuos con consumo problemático de alcohol, aunque la mayoría correspondían a posible dependencia.

Teniendo en cuenta que el cuestionario AUDIT es una herramienta de tamización y para caracterizar y seleccionar mejor nuestra muestra se aplicó otro cuestionario (ver anexo 3). Consistió en un cuestionario semiestructurado aplicado a los participantes al mismo tiempo que se realizó la toma de muestra sanguínea, se indago entre otras preguntas sobre el promedio de consumo de bebidas alcohólicas durante una sesión de consumo, la más cercana a la fecha de toma de muestra (abstinencia mínima de 48 horas), que de acuerdo con los participantes reflejaba en promedio su consumo por evento. Alrededor del 50% de los controles consumieron principalmente cerveza, mientras que los alcohol-dependientes de preferencia tomaron tres diferentes tipos de bebidas alcohólicas: cerveza, ron y aguardiente. Teniendo en cuenta el tipo de bebida, el volumen consumido y el grado de concentración de etanol en cada tipo de bebida, se calculó los gramos de alcohol tomados en un día habitual de consumo de alcohol, empleando la ecuación 2-1 descrita en el apartado de metodología. Se estableció que los sujetos del grupo de casos consumieron en promedio 309 g y en el grupo control en promedio 66 g por evento de consumo. Si observamos por género, tenemos que las 39 mujeres del grupo control en una sesión de consumo beben en promedio 58 g y los 34 hombres-74 g, mientras las 26 mujeres de los casos consumen 336 g y los 40 hombres-291 g de alcohol respectivamente. El puntaje AUDIT y los gramos de alcohol consumidos en una sesión de bebida nos permitieron categorizar nuestra muestra claramente en sujetos control y con problemas de consumo de alcohol y la mayoría de estos últimos (>50%) podrían catalogarse como alcohol-dependientes, no olvidar que para seleccionar mejor la muestra se aplicaron previamente otros criterios de inclusión y exclusión que se describieron en la metodología.

Con respecto al nivel socioeconómico no encontramos diferencias entre los dos grupos presentando igual proporción de individuos de estrato 2 y 3 como los mayoritarios. Cerca del 60% de individuos del grupo de casos, es decir individuos con consumo problemático de alcohol o que aquí catalogamos como alcohol-dependientes manifiestan el consumo de otro tipo de sustancias psicoactivas como la marihuana y tabaco, resultado con diferencia significativa con respecto al grupo control. Es necesario aclarar que, aunque como criterio de selección fue que la primera sustancia de consumo haya sido el alcohol y no se excluyeron los consumidores de otras sustancias debido a la imposibilidad de encontrar alcohol-dependientes puros. El grupo de casos declaran consumir otras sustancias psicoactivas y se diferencia en este aspecto del grupo control. Por otro lado, llama la atención que más del 50 % de los alcohol-dependientes manifestaron no saber o conocer si algún familiar tiene problemas de consumo de alcohol (tabla 2-4).

2.2.1 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALELICAS DE SNV'S EN LA REGION PROMOTORA DE LOS GENES SELECCIONADOS

Se evaluaron 29 variantes en 11 genes en alrededor de 77 muestras tanto de controles como de casos de consumo problemático de alcohol. Como es evidente, no todas las muestras fueron genotificadas exitosamente, se seleccionaron resultados con electroferogramas de secuencia claros y que no generaban incertidumbre en su asignación alélica. Por otro lado, como se puede observar en la tabla 2-5, los genes se encuentran en distintos cromosomas, y la mayoría de los marcadores están en equilibrio genético de Hardy Weinberg.

Nueve marcadores en cuatro genes mostraron un solo genotipo en ambos grupos, es decir fueron monomórficos y por tanto no presentan utilidad alguna en este estudio. El gen de la α -sinucleína (SNCA) presentó cuatro SNV's

monomórficos y fueron los siguientes, se resalta en negrilla el alelo único: rs989496677 (**C/T**), rs927159023 (**G/C**), rs950036657 (**G/A**), rs916862395 (**G/C**). También en el gen TNFR1 se presentaron dos marcadores monomórficos y fueron los siguientes: rs1030920578 (**G/A**), rs1032563104 (**G/T**). De igual forma las variantes rs1039347100 (**T/A**) y rs1394889070 (**G/T**) del gen RELA fueron también monomórficas y finalmente la variante rs41477046 del HMGB1 (**G/A**) también lo fue. Por otro lado, en la totalidad de genotipos de las variantes evaluadas no se observa diferencias estadísticamente significativas, es decir las frecuencias de genotipos no se diferenciaron en los alcohol-dependientes comparándolos con los controles, mientras en las frecuencias alélicas se observa un par alélico rs1470654147 (**C/T**) del gen IL-6R1 que mostro diferencias estadísticamente significativas, se resalta en negrilla el alelo minoritario (Tabla 2-6).

Tabla 2-5 Listado de genes, variantes genéticas estudiadas, frecuencia alélica mínima (MAF) y equilibrio de Hardy Weinberg tanto para controles como casos (consumo problemático de alcohol).

Gen	Variante	Localización en el Cromosoma	Alelos	MAF (control)	HWE Control (valor p)	HWE Casos (valor p)
SNCA	rs2619363	4q22.1	T/G	0,18	0,552	0,136
SNCA	rs542037441	4q22.1	G/T	0,01	0,947	Mono
SNCA	rs989496677	4q22.1	C/T	----	Mono	Mono
SNCA	-2171	4q22.1	T/A	0,26	0,019	0,003*
SNCA	rs927159023	4q22.1	G/C	---	Mono	Mono
SNCA	rs924048579	4q22.1	C/T	---	Mono	0,933
SNCA	rs2301134	4q22.1	G/A	0,44	0,321	0,742
SNCA	rs950036657	4q22.1	G/A	---	Mono	Mono
SNCA	rs916862395	4q22.1	G/C	---	Mono	Mono
SNCA STR-Rep1	D4S3481	4q22.1	263-277	0,02	0,000*	0,000*
IL6R	rs4845617	1q21.3	G/A	0,44	0,094	0,258
IL6R	rs1470654147	1q21.3	C/T	0,09	0,619	0,791

iNOS	rs2779248	17q11.2	C/T	0,33	0,186	0,765
IFNGR1	rs121913171	6q23.3	G/A	0,03	0,874	0,862
IFNGR1	rs17181457	6q23.3	G/A	0,06	0,627	0,005*
IFNGR1	rs2234711	6q23.3	A/G	0,39	0,876	0,380
IFNGR1	rs7749390	6q23.3	G/A	0,42	0,934	0,512
IFNAR1	rs2850015	21q22.11	C/T	0,45	0,009*	0,4641
IL12RB1	rs436857	19p13.11	G/A	0,05	0,711	0,461
IL12RB1	rs393548	19p13.11	T/A	0,10	0,496	0,342
TNFR1	rs1030920578	12p13.31	G/A	---	Mono	Mono
TNFR1	rs1032563104	12p13.31	G/T	---	Mono	Mono
TNFR1	rs4149621	12p13.31	T/C	0,16	0,000*	0,004*
TNFR1	rs4149570	12p13.31	C/A	0,17	0,011*	0,000*
TNFR1	rs2234649	12p13.31	T/G	0,11	0,548	0,917
MIF	rs893482429	22q11.23	G/C	0,09	0,078	0,925
RELA	rs1039347100	11q13.1	T/A	---	Mono	Mono
RELA	rs1394889070	11q13.1	G/T	---	Mono	Mono
HMGB1	rs41477046	13q12.3	G/A/T	---	Mono	Mono

*Diferencias estadísticamente significativas con $P < 0,05$

MAF: frecuencia alélica mínima

HWE: equilibrio de Hardy Weinberg

Tabla 2-6 Frecuencia de genotipos y alelos de diferentes SNV's de la región promotora de los genes candidatos seleccionados relacionados con respuesta inflamatoria en controles e individuos con consumo problemático de alcohol.

Gen SNV's	Grupo	N	Genotipo n (%)			Alelos n (%)	
			1/1	1/2	2/2	1	2
SNCA rs2619363 1=T, 2=G n=85	Controles	48	1(2)	15(31)	32(67)	17(18)	79(82)
	Uso problemático de alcohol	37	4(10)	11(30)	22(59)	19(26)	55(74)
	Chi cuadrado (p valor)		2,892 (0,235)			1,589 (0,207)	
SNCA rs5420374 41 n=93 1=G, 2=T	Controles	54	53(98)	1(2)	0(0)	107(99)	1(1)
	Uso problemático de alcohol	39	39(100)	0(0)	0(0)	78(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		0,730 (1,00)			0,049 (0,823)	
SNCA rs9894966 77	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático	39	39(100)	0(0)	0(0)	78(100)	0(0)

n=93 1=C, 2=T	de alcohol						
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
SNCA -2171 n=93 1=T,2=A	Controles	51	24(47)	27(53)	0(0)	75(74)	27(26)
	Uso problemático de alcohol	42	15(36)	27(64)	0(0)	57(68)	27(32)
	Chi cuadrado (p valor)		0,270 (0,298)			0,7193 (0,39639)	
SNCA rs9271590 23 [-2159] n=91 1=G,2=C	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	37	37(100)	0(0)	0(0)	74(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
SNCA rs9240485 79 [-2141] n=93 1=C, 2=T	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	39	38(97)	1(3)	0(0)	77(99)	1(1)
	Chi cuadrado (p valor)		0,237 (0,419)			0,0571 (0,8116)	
SNCA rs2301134 [-2127] N=93 1=G, 2=A	Controles	54	15(28)	31(57)	8(15)	61(56)	47(44)
	Alcohol Dependientes	39	10(26)	18(46)	11(28)	38(48)	40(52)
	Chi cuadrado (p valor)		2,570 (0,277)			1,096 (0,295)	
SNCA rs9500366 57 n=96 1= G, 2=A	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	42	42(100)	0(0)	0(0)	84(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
SNCA rs9168623 95 n=96 1=G, 2=C	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	42	42(100)	0(0)	0(0)	84(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
IL6R rs4845617 n=68 1=G, 2=A	Controles	32	8(25)	20(63)	4(13)	36(56)	28(44)
	Uso problemático de alcohol	36	10(28)	24(67)	2(5)	44(61)	28(39)
	Chi cuadrado (p valor)		1,020 (0,600)			0,3606 (0,5636)	
IL6R rs1470654 147 n=70 1=C, 2=T	Controles	34	28(82)	6(18)	0(0)	62(91)	6(9)
	Uso problemático de alcohol	36	22(61)	12(33)	2(6)	56(78)	16(22)
	Chi cuadrado (p valor)		3,039 (0,218)			4,7401 (0,0294)*	
iNOS rs2779248	Controles	24	12(50)	8(33)	4(17)	32(67)	16(33)
	Uso	35	15(43)	15(43)	5(14)	45(64)	25(36)

n=59 1=T, 2=C	problemático de alcohol						
	Chi cuadrado (p valor)		0,543 (0,762)			0,0712 (0,789)	
IFNGR1 rs1219131 71 n=77 1=G, 2=A	Controles	38	36(95)	2(5)	0(0)	74(97)	2(3)
	Uso problemático de alcohol	39	37(95)	2(5)	0(0)	76(97)	2(3)
	Chi cuadrado (p valor)		0,001 (0,979)			0,0007 (0,979)	
IFNGR1 rs1718145 7 n=80 1=G, 2=A	Controles	40	35(88)	5(12)	0(0)	75(94)	5(6)
	Uso problemático de alcohol	40	31(78)	6(15)	3(7)	68(92)	6(8)
	Chi cuadrado (p valor)		3,333 (0,189)			0,2001 (0,6546)	
IFNGR1 rs2234711 n=66 1=A, 2=G	Controles	36	14(39)	16(44)	6(17)	44(61)	28(39)
	Uso problemático de alcohol	30	10(33)	17(57)	3(10)	37(62)	23(38)
	Chi cuadrado (p valor)		1,161 (0,560)			0,0043 (0,9479)	
IFNGR1 rs7749390 n=75 1=G, 2=A	Controles	39	6(15)	17(44)	16(41)	29(47)	49(63)
	Uso problemático de alcohol	36	5(14)	20(55)	11(31)	30(42)	42(58)
	Chi cuadrado (p valor)		0,632 (0,729)			0,366 (0,5451)	
IFNAR1 rs2850015 n=72 1=C, 2=T	Controles	40	8(20)	28(70)	4(10)	44(55)	36(45)
	Uso problemático de alcohol	32	8(25)	18(56)	6(19)	34(53)	30(47)
	Chi cuadrado (p valor)		1,706 (0,4261)			0,050 (0,8224)	
IL12RB1 rs436857 n=70 1=G, 2=A	Controles	30	27(90)	3(10)	0(0)	57(95)	3(5)
	Uso problemático de alcohol	40	31(78)	9(22)	0(0)	71(89)	9(11)
	Chi cuadrado (p valor)		1,886 (0,212)			1,709 ⁺ (0,1911)	
IL12RB1 rs393548 n=70 1=T, 2=A	Controles	30	24(80)	6(20)	0(0)	54(90)	6(10)
	Uso problemático de alcohol	40	29(73)	11(27)	0(9)	69(86)	11(14)
	Chi cuadrado (p valor)		0,524 (0,469)			0,1668 ⁺ (0,6811)	
TNFR1 rs1030920 578 n=78	Controles	54	54(100)	0(0)	0(0)	108(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	24	24(100)	0(0)	0(0)	48(100)	0(0)

1=G, 2=A	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
TNFR1 rs1032563 104 n=78 1=G, 2=T	Controles	42	42(100)	0(0)	0(0)	84(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	36	36(100)	0(0)	0(0)	72(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
TNFR1 rs4149621 n=74 1=T, 2=C	Controles	38	32(84)	0(0)	6(16)	64(84)	12(16)
	Uso problemático de alcohol	36	26(72)	4(11)	6(17)	56(78)	16(22)
	Chi cuadrado (p valor)		2,304 (0,315)			1,4839 (0,2231)	
TNFR1 rs4149570 n=62 1=C, 2=A	Controles	36	28(78)	4(11)	4(11)	60(83)	12(17)
	Uso problemático de alcohol	26	24(92)	0(0)	2(8)	48(92)	4(8)
	Chi cuadrado (p valor)		1,519 (0,467)			2,1638 (0,1412)	
TNFR1 rs2234649 n=46 1=T, 2=G	Controles	22	17(77)	5(23)	0(0)	39(89)	5(11)
	Uso problemático de alcohol	24	23(96)	1(4)	0(0)	47(98)	1(2)
	Chi cuadrado (p valor)		3,486 (0,090)			1,8994 (0,1681) ⁺	
MIF rs8934824 29 n=56 1=G, 2=C	Controles	24	21(88)	2(8)	1(4)	43(91)	4(9)
	Uso problemático de alcohol	32	30(94)	2(6)	0(0)	61(97)	2(3)
	Chi cuadrado (p valor)		1,475 (0,478)			0,6316 (0,4217) ⁺	
RELA rs1039347 100 n=74 1=T, 2=A	Controles	38	38(100)	0(0)	0(0)	76(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	36	36(100)	0(0)	0(0)	72(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
RELA rs1394889 070 n=70 1=G, 2=T	Controles	35	35(100)	0(0)	0(0)	70(100)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	35	35(100)	0(0)	0(0)	70(100)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	
HMGB1 rs4147704 6 n=70 1=G, 2=A	Controles	35	35(100)	0(0)	0(0)	70(50)	0(0)
	Uso problemático de alcohol	35	35(100)	0(0)	0(0)	70(50)	0(0)
	Chi cuadrado (p valor)		Monomórfico			Monomórfico	

*Diferencias estadísticamente significativas con $P < 0,05$

⁺Corrección de Yates

Siguiendo el modelo de herencia más general, el codominante y empleando el genotipo homocigoto de mayor frecuencia como de referencia, se evaluó la asociación entre las variantes génicas y la susceptibilidad al alcoholismo estimando los odds ratio o razón de probabilidades. Se asumió que el alelo y genotipo de menor frecuencia son de riesgo comparado con el alelo y/o genotipo silvestre, de mayor frecuencia (ver Tabla 2-7).

Tabla 2-7 Frecuencias genotípicas en individuos con uso problemático del alcohol y controles y su riesgo de susceptibilidad (modelo genético codominante).

Gen SNV's	Genotipo	Uso problemático de Alcohol (%)	Control (%)	Chi ² + (valor p)	OR (95% CI)	Test exacto de Fisher (valor P) ⁺
SNCA rs2619363 n=85	GG	22(59)	32(67)	0,018(0,894) 1,49(0,222)	1,06 (0,41-2,75) 5,82 (0,61-55,62)	0,133 (0,8939) 1,529 (0,1263)
	GT	11(30)	15(31)			
	TT	4(10)	1(2)			
SNCA -2171 n=93	TT	15(36)	24(47)	0,796(0,372)	1,60 (0,69-3,69) 1,58(0,029-83,85)	1,10 (0,2711) 0,226 (0,8212)
	TA	27(64)	27(53)			
	AA	0(0)	0(0)			
SNCA rs2301134 [-2127] N=93	GG	10(26)	15(28)	0,0004 (0,983) 0,029 (0,865)	0,87 (0,32-2,34) 2,06 (0,61-6,93)	0,274 (0,7842) 1,170 (0,2418)
	GA	18(46)	31(57)			
	AA	11(28)	8(15)			
IL6R rs4845617 n=68	GG	10(28)	8(25)	0,043 (0,835) 0,222(0,638)	0,96 (0,31-2,89) 0,40(0,057-2,77)	0,073 (0,9422) 0,928 (0,3534)
	GA	24(67)	20(63)			
	AA	2(5)	4(13)			
IL6R rs1470654 147 n=70	CC	22(61)	28(82)	1,89 (0,16932)	2,54 (0,82-7,86) 6,33 (0,29-138,6)	1,624 (0,1045) 1,172 (0,2411)
	CT	12(33)	6(18)			
	TT	2(6)	0(0)			
iNOS rs2779248 n=59	TT	15(43)	12(50)	0,164 (0,6851) 0,150 (0,6985)	1,50 (0,47-4,71) 1,00 (0,22-4,56)	0,694 (0,487) 0,000 (1,000)
	TC	15(43)	8(33)			
	CC	5(14)	4(17)			
IFNGR1 rs1219131 71 n=77	GG	37(95)	36(95)	0,24 (0,6263)	0,97 (0,13-7,28) 0,97 (0,018-50,4)	0,027 (0,9787) 0,013 (0,9893)
	GA	2(5)	2(5)			
	AA	0(0)	0(0)			

IFNGR1 rs1718145 7 n=80	GG GA AA	31(78) 6(15) 3(7)	35(88) 5(12) 0(0)	0.019 (0,89)	1,35 (0,37-4,88) 7,89 (0,39-158,7)	0,464 (0,6423) 1,349 (0,1775)
IFNGR1 rs2234711 n=66	AA AG GG	10(33) 17(57) 3(10)	14(39) 16(44) 6(17)	0,217(0,64) 0,0013(0,97)	1,49 (0,51-4,29) 0,70 (0,14-3,48)	0,734 (0,4630) 0435 (0,6634)
IFNGR1 rs7749390 n=75	GG GA AA	5(14) 20(55) 11(31)	6(15) 17(44) 16(41)	0,29(0,59) 0.002 (0,96)	1,50 (0,55-4,10) 1,33(0,28 -6.44)	0.789 (0.4299) 0.358 (0.7204)
IFNAR1 rs2850015 n=72	CC CT TT	8(25) 18(56) 6(19)	8(20) 28(70) 4(10)	0,576 (0,45) 3,6 (0,058)	1.56 (0,49-4,89) 0,67 (0,13-3.30)	0,756 (0,4495) 0,497 (0,6195)
IL12RB1 rs436857 n=70	GG GA AA	31(78) 9(22) 0(0)	27(90) 3(10) 0(0)	1.11(0,29)	2,61 (0,64-10,64) 0,87 (0,02-45,49)	1,340 (0,1802) 0,067 (0,9463)
IL12RB1 rs393548 n=70	TT TA AA	29(73) 11(27) 0(0)	24(80) 6(20) 0(0)	0.20(0,66)	1,52 (0,49-4,71) 0.83 (0,016-43,4)	0,722 (0,4705) 0,092 (0,9267)
TNFR1 rs4149621 n=74	TT TC CC	26(72) 4(11) 6(17)	32(84) 0(0) 6(16)	0.0001(0,99)	11,0 (0,57-214,4) 1,23 (0,35-4,27)	1,587 (0,1126) 0,327 (0,436)
TNFR1 rs4149570 n=62	CC CA AA	24(92) 0(0) 2(8)	28(78) 4(11) 4(11)	0.027 (0,87)	0,096 (0,005-1,9) 0,43 (0,072- 2,55)	1,549 (0,1213) 0,932 (0,3516)
TNFR1 rs2234649 n=46	TT TG GG	23(96) 1(4) 0(0)	17(77) 5(23) 0(0)	2,04 (0,15)	0,15 (0,016-1,38) 0,74 (0,014-39,4)	1,675 (0,0939) 0,146 (0,8842)
MIF rs8934824 29 n=56	GG GC CC	30(94) 2(6) 0(0)	21(88) 2(8) 1(4)	0,033 (0,86)	0,70 (0,091-5,37) 0,24 (0,0091-6,1)	0,343 (0,7316) 0,874 (0,3821)

+ Corrección de Yates

Las frecuencias genotípicas obtenidas de los SNV's seleccionados no indican alguna diferencia entre el grupo control y el de voluntarios con problemas de consumo de alcohol (tabla 2-7). De igual forma al comparar los resultados del único STR analizado no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (tabla 2-8). Se aprecian 11 diferentes genotipos combinando los ocho alelos de diferente longitud determinados para la muestra tomada, siendo predominantes

SNCA rs2619363	0,73	0,30- 1,78	0,49	0,18	0,02- 1,64	0,085	0,64	0,31- 1,32	0,23
SNCA rs230113	0,90	0,35- 2,28	0,82	0,44	0,16- 1,23	0,12	0,72	0,39- 1,32	0,28
IL6R rs147065	0,34	0,07- 1,61	0,16	0,00	0.00-NA	0,24	0,4	0,08- 1,45	0,12
iNOS rs2779248	0,75	0,26- 2,13	0,59	1,20	0,29- 5,02	0,8	0,91	0,44- 1,88	0,8
IFNGR1 rs1718145 7	0,49	0,15- 1,63	0,24	0,00	0.00-NA	0,039	0,46	0,17- 1,25	0,1
IFNGR1 rs2234711	0,79	0,29- 2,16	0,64	1,80	0,41- 7,91	0,43	1,03	0,50- 2,11	0,95
IFNGR1 rs7749390	0,68	0,26- 1,79	0,43	0,94	0,21- 4,09	0,93	0,80	0,39- 1,63	0,53
IFNAR1 rs2850015	4,67	0,83- 26,34	0,05 9	0,85	0,08- 9,30	0,89	2,06	0,68- 6,23	0,2
TNFR1 rs4149621	0,49	0,10- 2,43	0,37	0,94	0,16- 5,39	0,94	0,79	0,33- 1,90	0,6
TNFR1 rs4149570	3,43	0,34- 34,99	0,26	1,50	0,12- 18,54	0,75	1,68	0,45- 6,23	0,41

Utilizando modelos de regresión logística para ajustar el modelo según las variables de factores de confusión como sexo, edad, edad de inicio de consumo se encontró asociación entre el genotipo AA del marcador rs4149621 del gen TNFR1 en hombres con la protección hacia la susceptibilidad al alcoholismo. (Tabla 2-10). Los datos se obtuvieron empleando el primer “reverse” y por tanto el genotipo reportado debe ser el complementario, TT.

Tabla 2-10 Análisis de interacción de genotipos con covariable sexo mediante regresión logística comparando controles e individuos con consumo problemático de alcohol.

Gen y SNV	Genotipo	Parámetros			Sexo
		OR	95% CI	Valor P	
SNCA rs2619363 n=85	G/G	0.24	(0.08-0.78)	0.4	Hombre
	G/T	0.27	(0.08-0.94)		
	T/T	0.11	(0.01-1.25)		

SNCA rs542037441 n=93	G/G	0.24	(0.10-0.60)	NA	Hombre
SNCA -2171 n=93	A/T	0.17	(0.05-0.67)	0.68	Hombre
SNCA rs924048579 n=93	C/C	0.26	(0.11-0.65)	NA	Hombre
SNCA rs2301134 n=93	A/A	0.20	(0.04-0.97)	0,9	Hombre
TNFR1 rs4149621 n=62	T/T	0.10	(0.02-0.56)	0.048*	Hombre
TNFR1 rs2234649 n=46	T/T	0.24	(0.06-0.91)	0.15	Hombre

*Diferencias estadísticamente significativas con $P < 0,05$

2.2.2 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Mediante el programa SNPstats se determinaron los posibles haplotipos para cuatro grupos de marcadores ubicados en los genes TNFR1, SNCA, IFNGR1 e IL12RB1. Se estimaron sus frecuencias haplotípicas y odds ratio (Tablas 2-11 y 2-12) ajustados por sexo, edad y edad de inicio del consumo como variables de confusión. Solo el haplotipo GGCAGCAGG en el gen SNCA presenta frecuencias haplotípicas no muy bajas en controles y casos, de 10 y 6 % respectivamente, siendo un factor de protección hacia el consumo problemático de alcohol. Mientras los otros marcadores con diferencias significativas, en uno de los grupos no presentaban o presentaba frecuencias muy bajas. Al realizar el análisis teniendo en cuenta factores de confusión como sexo, edad y edad de inicio del consumo se encuentra en hombres, un haplotipo en el gen TNFR1-GGTCT que

está asociado con la protección hacia el alcoholismo con una frecuencia elevada en el grupo control. Mientras, el haplotipo GGA en IFNGR1 en la muestra se asocia a protección con una frecuencia del 5% en los controles y cero en los casos, mientras en hombres-casos la frecuencia estimada baja al 3 %.

Tabla 2-11 Frecuencias de haplotipos de marcadores y asociación con riesgo de susceptibilidad a consumo problemático de alcohol en casos y controles, ajustados por sexo, edad y edad de inicio del consumo.

Gen	SNV's	Haplotipo	Freq (control)	Freq (casos)	Odds ratio	[95% CI]	P Valor
TNFR1	rs1030920578	GGTCT	0,79	0,65	1	----	---
	rs1032563104	GGCCT	0,14	0,11	0,66	0,15-2,80	0,57
	rs4149621	GGTAT	NA	0,14	3,08	0,15-61,8	0,47
	rs4149570	GGCAG	0,056	0,024	0,87	0,12 -6,16	0,89
	rs2234649	GGTCG	0	0,057	4,7X10²¹	4,7-4,7(10²¹)	<0,0001*
		GGCCG	0	0,024	7,1X10⁸	7,1-7,1(10⁸)	<0,0001*
SNCA	rs2619363	GGCTGCGGG	0,31	0,45	1	--	--
	rs542037441	GGCTGCAGG	0,20	0,20	0,51	0,12 -2,22	0,37
	rs989496677	TGCTGCAGG	0,17	0,10	0,28	0,05 -1,59	0,15
	-2171	GGCAGCGGG	0,13	0,11	0,11	0,01-1,51	0,1
	rs927159023	GGCAGCAGG	0,10	0,06	0,15	0,03-0,83	0,032*
	rs924048579	TGCAGCAGG	0,03	0,08	0,92	0,08-10,85	0,95
	rs2301134	TGCAGCGGG	0,05	0			
	rs950036657	GTCTGCGGG	0	0,009			
	rs916862395	TGCTGTAGG	0,001	0			
		TGCTGCGGG	0	0			
rs916862395	TGCTGTGGG	0	0				
IFNGR1	rs121913171	GGAA	0,57	0,57	1	---	--
	rs17181457	GGGG	0,24	0,26	1,17	0,46 -3,01	0,75
	rs2234711	GAGG	0,10	0,04	0,45	0,10 -1,97	0,29
	rs7749390	GAAA	0,05	0,02	0,57	0,08- 4,09	0,58
		GGGA	0	0,05	1,8X10⁷	1,8X10⁷-	<0,0001*
	GGAG	0,02	0,03	2,40	1,8X10⁷	0,5	
	AGGG	0,01	0,01	0,57	0,19 - 30,63	0,67	
	AGGA	0	0,01		0,04 - 7,49		
	GAAG	0	0,01				
	AGAG	0,01	0				
IL12RB 1	rs436857	GT	0,82	0,90	1	--	--
	rs393548	AA	0,08	0,05	0,51	0,12 - 2,27	0,38
		GA	0,06	0,05	0,48	0,08 - 2,88	0,43
		AT	0,03	0	0,00	Inf - Inf	1

*Diferencias estadísticamente significativas con P<0,05

Tabla 2-12 Resultados con diferencias estadísticamente significativas en el análisis de interacción de haplotipos con covariable sexo mediante regresión logística. Ajustados por sexo, edad y edad de inicio del consumo.

Gen y SNV	Haplotipo	Frecuencia	Parámetros			Sexo
			OR	95% CI	Valor p	
TNFR1 rs1030920578 rs1032563104 rs4149621 rs4149570 rs2234649	GGTCT	0,72	0,08	0,01 -0,54	0,014*	Hombre
IFNGR1 rs121913171 rs17181457 rs2234711 rs7749390	GGGA	0,03	18593193,7	18593189.9 - 18593197.3	<0.0001	Hombre

***Diferencias estadísticamente significativas con P<0,05**

Además de la correlación estadística entre las diferentes variantes génicas ubicadas cercanamente en el mismo cromosoma, se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento obteniéndose los estadísticos D, D´ y R presentados en la tabla 2-13. Se observan cuatro pares de alelos en desequilibrio de ligamiento, tres de los cuales presentan valores elevados para el parámetro D´, ubicados en los genes TNFR1, SNCA e IFNGR1.

Tabla 2-13 Estadísticos de análisis de múltiples SNV´s: (por pares) desequilibrio de ligamiento y haplotipos.

Haplotipos		D	D´	R	Chi ² (Valor P)
TNFR1 rs4149621 rs4149621 rs4149570	TNFR1 rs4149570 rs2234649 rs2234649	0,020 0,026 0,022	0,191 0,490 0,389	0,152 0,268 0,267	1,30 (0,2546) 4,59 (0,032) * 3,56 (0,059)
SNCA rs924048579 -2171 -2171 rs542037441 rs542037441 rs542037441	SNCA rs2301134 rs924048579 rs2301134 -2171 rs924048579 rs2301134	2,79x10 ⁻³ -1,4x10 ⁻³ 3x10 ⁻³ 1,4x10 ⁻³ 4,18x10 ⁻⁵ -2,44x10 ⁻³	0,975 0,952 0,021 0,952 0,008 0,972	0,0765 -0,0430 0,0135 -0,043 0,0078 -0,0670	1,088 (0,297) 0,340 (0,560) 0,0335 (0,855) 0,341 (0,560) 0,0114 (0,915) 0,835 (0,361)

rs2619363	rs542037441	-1,07x10 ⁻³	0,934	-0,0357	0,217 (0,641)
rs2619363	-2171	1,78x10 ⁻²	0,116	0,098	1,60 (0,206)
rs2619363	rs924048579	4,17x10 ⁻³	0,983	0,139	3,30 (0,069)
rs2619363	rs2301134	8,79x10 ⁻²	0,780	0,431	31,61 (1,87x10⁻⁸)*
IFNGR1	IFNGR1				
rs2234711	rs7749390	0,194	0,887	0,883	84,72 (2x10⁻¹⁶)*
rs17181457	rs2234711	0,023	0,360	0,157	3,23 (0,072)
rs17181457	rs7749390	0,040	0,587	0,272	10,33 (0,001)*
rs121913171	rs17181457	-0,003	0,971	-0,055	0,46 (0,498)
rs121913171	rs2234711	0,016	0,995	0,205	5,37 (0,020)*
rs121913171	rs7749390	0,007	0,431	0,095	1,23 (0,267)
IL12RB1	IL12RB1				
rs436857	rs393548	0.0569	0.756	0.6226	0

***Diferencias estadísticamente significativas con P<0,05**

2.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presenta el primer estudio en Colombia donde se evalúan 29 variantes génicas en 11 genes de respuesta inflamatoria en una muestra de individuos con consumo problemático de alcohol comparado con un grupo control. Se realizó una convocatoria por redes sociales de la universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, para participar en el estudio, a la cual respondieron aproximadamente 400 individuos en tres fases o momentos diferentes. Se seleccionaron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión casi 200 individuos, de los cuales a 139 se les tomó muestra sanguínea, 73 se clasificaron como controles y 66 como individuos con consumo problemático de alcohol. El grupo control presentó una proporción equilibrada entre hombres y mujeres, mientras en los consumidores de alcohol había una mayor proporción de hombres, casi el doble con respecto a las mujeres y esto era de esperarse, pues una de las características del “alcoholismo” en mujeres es su ocultismo, quizás por el sentimiento de culpa que desarrollan las consumidoras o el miedo a la percepción social hacia el consumo en mujeres, que es diferente al que se genera en hombres (162). Llama la atención, que más del 80% de los participantes tanto controles como casos iniciaron el consumo de alcohol antes de los 18 años, lo

que confirma la tendencia observada a nivel mundial de mayor consumo de alcohol en adolescentes y niños, conducta que erróneamente se ha banalizado y naturalizado. Igualmente, en el grupo de consumo problemático de alcohol predominan los estudiantes de programas académicos de pregrado, es decir individuos más jóvenes, confirmando la tendencia previamente enunciada (163,164). También, llama la atención que el promedio de la cantidad de alcohol consumida en gramos por evento por parte de las mujeres del grupo de casos era mayor que en hombres, fenómeno que también se ha observado en otros países en los últimos tiempos, es decir el mayor consumo de alcohol por parte de las mujeres(164). Finalmente, se observa una diferencia estadísticamente significativa en el consumo de otras sustancias psicoactivas por parte del grupo de casos con relación a los controles. Los participantes del grupo de casos se clasificaron como policonsumidores ya que es prácticamente imposible encontrar consumidores puros de alcohol, se hace la salvedad que se seleccionaron los casos con primera sustancia y predominante de consumo – el alcohol. Todos los datos conocidos para los últimos años apuntan al consumo simultáneo de varias drogas psicoactivas (policonsumo) como conducta más prevalente en el mundo. En relación con esto es preciso señalar que el alcohol está presente en el 90% de los policonsumos en diferentes grupos poblacionales (165).

La alcohol-dependencia es una patología multifactorial donde las variantes genéticas (SNV's, STR's, CNV's etc.) y ambientales pueden afectar la susceptibilidad tanto de manera individual como sinérgicamente (166). En general, las variantes polimórficas en la región promotora podrían alterar los patrones de expresión y/o regulación de los genes y esto verse reflejado funcionalmente; por esta razón han despertado el interés de su estudio en esta y en otras patologías complejas y en muy diversos grupos de genes de vías específicas, más que en genes individuales (167).

Este estudio fue llevado a cabo en una muestra de población universitaria colombiana analizando los datos de frecuencias alélicas de 29 variantes, la mayoría se encontró en equilibrio genético de Hardy Weinberg (HW), excepto para los casos de alcohol-dependientes con los marcadores SNCA -2171 y IFNGR1 rs17181457 y en controles el marcador rs2850015 del gen IFNAR1. Además, tanto en controles como en casos no estaban en equilibrio de HW los siguientes marcadores: rep-1 y rs4149621 en SNCA y rs4149570 en el gen TNFR1. Al encontrar algunos marcadores en desequilibrio genético de Hardy Weinberg podría pensarse que quizás el tamaño pequeño de la muestra genere cambios aleatorios en las frecuencias alélicas y genotípicas y no sean representativas o por otro lado, quizás hubo errores en la genotipificación, lo cual trato de minimizarse al momento del desarrollo experimental (secuenciando en ambos sentidos, tomando solo secuencias bien definidas) y al realizar el análisis de los resultados. La otra opción es que realmente son variantes asociadas con la enfermedad en estudio. Otra forma de refutar algunos de los argumentos anteriores, es comparar las frecuencias obtenidas en este estudio con las reportadas a nivel mundial para población europea, africana y latinoamericana. Teniendo en cuenta la etnicidad de la población colombiana se consultó la página web de proyecto alfa (allelic frequency aggregator) las frecuencias para caucásicos, africanos y nativos americanos de la mayor parte de estos marcadores (168). En la tabla S-1 del anexo se puede observar que la mayoría de las frecuencias alélicas obtenidas son muy similares a las reportadas para Europa, algunas cercanas a las latinoamericanas y unas pocas son similares a las africanas. La muestra fue tomada en la ciudad de Bogotá y el resultado refleja la etnicidad de sus habitantes, lo cual se ha observado en reportes de otro tipo de marcadores genéticos (16). De lo anterior y de los análisis de equilibrio de HW podemos decir que la muestra es suficiente para realizar nuestros análisis, es representativa y no hay problema en continuar con el estudio. Como hallazgo particular, para tres marcadores determinados en este estudio SNCA -2171, SNCA rs9224048519 y TNFR1 rs1032563104 no hay reportes de frecuencias en

otras poblaciones a nivel mundial y particularmente el marcador SNCA -2171 es una variante polimórfica reportada por primera vez por nuestro grupo de investigación en trabajo previo asociado a esta línea de investigación (6).

La tabla 2-6 muestra la comparación de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en casos y controles y la asociación con el consumo problemático de alcohol de acuerdo con el modelo de herencia codominante. No se encuentra ningún genotipo de las 29 variantes genéticas determinadas en 9 genes asociados a la patología en estudio. Se aprecia que solamente el alelo T de rs1470654147 del gen IL6R está asociado con mayor susceptibilidad al consumo problemático de alcohol para sus portadores, aunque no se encuentran diferencias en la síntesis de ARNm y proteína de IL6R al comparar los dos grupos sin estratificar, aunque si hay diferencias estratificando por sexo de los participantes (ver más adelante). Esta variante está ubicada en la posición -423 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. Empleando el programa Lasagna 2.0(169) se buscó los factores de transcripción que pueden interacción con esta región del promotor encontrándose que SP1 y HNF-4 son los dos factores que se unen a secuencias delimitadas dentro del polimorfismo. Despierta particular interés el factor SP1, un factor de transcripción ubicuo que regula la transcripción de genes constitutivos independientemente del estado de metilación de islas CpG cercanas(170). En algunas poblaciones se ha encontrado asociación de diversos polimorfismos en genes de interleuquinas y sus receptores con enfermedades psiquiátricas y sugieren la importancia de éstas durante el desarrollo temprano y su efecto en el neurodesarrollo y la susceptibilidad a enfermedades mentales, aunque no se ha encontrado esta asociación con alcoholismo o consumo problemático de alcohol hasta la fecha(171).

Al igual que nuestro estudio, algunos autores han realizado estudios de asociación de SNV's en el gen SNCA y alcoholismo en pacientes de origen europeo de los Estados Unidos de América, sin encontrar relación con la

dependencia, aunque sí con la característica de búsqueda intensa de alcohol (craving) con ocho SNV's en este gen (172). Adicionalmente, han asociado un fenotipo intermedio como de degustación del alcohol con dos SNV's (rs2583985 y rs356168) de SNCA y respuestas generadas en el cerebro (173). Solo un polimorfismo de longitud en SNCA llamado Rep-1 ha sido asociado a la susceptibilidad al alcoholismo, siendo más frecuente el alelo corto en individuos con uso problemático del alcohol. Esta variante conlleva a una menor expresión en SNCA en los cerebros de los pacientes alcohol-dependientes (112,174). En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre los grupos con relación a esta variante de longitud Rep-1, aunque la frecuencia del alelo corto (267 pb) fue 10% mayor en individuos con uso problemático del alcohol (tal cual como se ha reportado en otras poblaciones) y el valor P estuvo cercano a la diferencia estadísticamente significativa, lo que sugiere que es necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar o refutar este hallazgo.

Al estratificar la muestra por sexo se encontró el genotipo AA del marcador rs4149621 del gen TNFR1 en hombres está asociado con la protección hacia la susceptibilidad al alcoholismo. Es conocido que el consumo crónico de alcohol induce la inflamación a nivel intestinal aumentando los niveles de TNF alfa con aumento de la permeabilidad intestinal y causando posteriormente la inflamación hepática. La interacción TNF alfa y TNFR1/2 son fundamentales en la transducción de señales y la intervención farmacológica sobre esta vía ha mostrado que la estabilización de la barrera intestinal disminuye la inflamación y protege contra la acción del alcohol y quizás variantes polimórficas como la encontrada en este estudio en el receptor tipo 1 de TNF alfa alterarían esa transducción de señales y la respuesta inflamatoria del organismo (175).

Por otro lado, otro gen que ha llamado la atención en nuestro estudio es MIF, que presentó diferencias en expresión y metilación (ver más adelante), aunque no se hallaron variantes en el segmento del promotor estudiado. Aunque, en la literatura encontramos que otras variantes, por ejemplo -173C o (CATT)₇ están asociadas

con incidencia o gravedad de varias enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, artritis inflamatoria juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, enfermedad celiaca etc., aunque no hay reportes de asociación con enfermedades de adicción. Estas variantes de este marcador no fueron evaluados en nuestro estudio y valdría la pena evaluarlas a futuro.

En la mayoría de las patologías multifactoriales, el factor genético es debido a la co-herencia de múltiples variantes de bajo riesgo que tienen efectos sinérgicos, es decir que su efecto es mayor que la suma individual del efecto de cada variante por separado y el efecto umbral, un límite de adición de factores, por debajo del cual el rasgo no se expresa. Adicionalmente, la etnicidad juega un papel importante en su variabilidad. Como es conocido, el hallazgo de estos biomarcadores para la detección de susceptibilidad es de suma importancia para una patología como la alcohol-dependencia y por tanto es preciso analizar múltiples SNV's en diferentes genes y poblaciones. Teniendo en cuenta que el aporte de marcadores individuales se diluye, sobre todo en una muestra de tan pequeño tamaño como la nuestra, hemos analizado varios SNV's heredados en bloque en un mismo gen, es decir los haplotipos, segmentos cromosómicos que quizás albergan variantes que predisponen o protegen hacia esta patología. En nuestro estudio nos enfocamos en cuatro genes, particularmente: TNFR1, SNCA, IFNGR1 y IL12RB1. Los datos de análisis de haplotipos realizados mediante el software SNPStats que se presenta en la tablas 2-11 y 2-12 revelan que los 5 SNV's que constituyen los haplotipos del gen TNFR1 podría haber 32 combinaciones de alelos diferentes, sólo 3 acumulan el 99 % de los alcohol-dependientes y 6 combinaciones el 100 % de los controles. De igual forma, los haplotipos del gen SNCA con 9 SNV's podrían tener 512 combinaciones, aunque sólo 7 y 8 acumulan el 100 % de controles y alcohol-dependientes, respectivamente. Por otro lado, el gen IFNGR1 con 4 SNV's analizados podría

presentar 16 combinaciones diferentes, sólo 7 acumulan el 100 % tanto de controles como alcohol-dependientes. Finalmente, el gen IL12RB1 con dos SNV's podría presentar 4 combinaciones, una acumula más del 80 % de individuos de los dos grupos poblacionales estudiados. En este estudio hemos encontrado cuatro haplotipos asociados a la susceptibilidad, tres de los cuales poseen frecuencias haplotípicas muy bajas o nulas que podrían estar relacionadas con el tamaño de la muestra y/o limitaciones en los programas de estimación de estas frecuencias. Analizando nuestros datos y ajustándolos por covariables como sexo, edad y edad de inicio de consumo, encontramos en el gen SNCA el haplotipo GGCAGCAGG (conformado por los siguientes marcadores: rs2619363, rs542037441, rs989496677, -2171, rs927159023, rs924048579, rs2301134, rs950036657 y rs916862395) con frecuencias haplotípicas superiores a 5%, con un odd ratio de 0,15 e intervalo de confianza menor a uno (0,03-0,83) y valor de P significativo (0,032) está asociado como un haplotipo de protección. De igual forma se encontró el haplotipo GGTCT en el gen TNFR1 (rs1030920578, rs1032563104, rs4149621, rs4149570 y rs2234649) en hombres con un odds ratio de 0,08 e intervalo de confianza entre 0,01-0,54 y un valor de p de 0,014 significativo, también está asociado a la protección. En el gen IFNGR1 (rs121913171, rs17181457, rs2234711 y rs7749390) el haplotipo GGGA con una frecuencia cercana al 3 % en hombres con consumo problemático de alcohol representa un factor de riesgo significativo, aunque la baja frecuencia representa una limitante en los programas de estimación de las frecuencias haplotípicas. Por otro lado, analizando parejas de marcadores, el haplotipo del gen IFNGR1 entre los marcadores rs121913171 y rs2234711 presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento $D' > 0,9$ y su variante haplotípica TT se presenta con mayor frecuencia en los casos. Este mismo gen presenta un segundo haplotipo entre los marcadores rs2234711 y rs7749390 con un gran desequilibrio $D' > 0,8$, y la variante CA asociada a protección. De igual forma se encontró haplotipos bialélicos con los marcadores rs4149621 y rs2234649 en el gen TNFR en donde el haplotipo AC se asocia con protección, aunque su $D' = 0,48$ muestra un

desequilibrio de ligamiento intermedio y por último en hombres los marcadores rs2619363 y rs2301134 del gen SNCA presentan el haplotipo CT asociado a protección contra el alcoholismo, presentando un fuerte desequilibrio de ligamiento ($D' = 0,78$). En la literatura encontramos varios estudios de haplotipos y alcoholismo en donde se reportan asociaciones de la enfermedad a un haplotipo particular en genes como la galanina, el receptor 2 de la dopamina (DRD2), algunos receptores del gusto TAS2Rs, receptores del neurotransmisor GABA (GABRG1 y GABRA2), receptor de la hormona liberadora de la corticotropina (CRHR1), un transportador de monoaminas (SLC18A2) etc. De los genes incluidos en este estudio solamente se han reportado haplotipos para el gen de la alfa sínucleína (SNCA) y su pobre asociación con el alcoholismo o fenotipos similares como consumo problemático y otras adicciones (176–181). El haplotipo encontrado en este estudio en casos de sexo masculino en el promotor del gen TNFR1-GGTCT asociado a protección frente al consumo problemático de alcohol y su menor expresión proteica (ver siguiente capítulo) quizás se relacione con disminución de la afinidad de factores de transcripción y por tanto descenso de tasa de transcripción y traducción. Con los resultados anteriores los genes TNFR1, SNCA e IFNGR1 se perfilan como candidatos para estudios más profundos de su relación con la patología de nuestro interés como lo es la alcohol-dependencia.

El alcoholismo es una enfermedad compleja en donde tanto factores ambientales como genéticos contribuyen a la susceptibilidad. Numerosos son los genes que han relacionado con esta patología, los cuales de manera individual tienen aportes modestos al fenotipo, además de poseer múltiples interacciones entre ellos y con el medio ambiente y no solamente de tipo aditivo. La epistasia, es otro tipo de interacción genética que podría explicar un gran porcentaje de la variabilidad genética que presenta la alcohol-dependencia. El método de reducción dimensional multifactorial (MDR) diseñado para el estudio de

asociación de casos y controles de pequeño tamaño muestral fue empleado en nuestro análisis. Se emplearon 25 SNV's (50 alelos) de 8 genes seleccionados, involucrados en respuesta inflamatoria, y las características de tipo ambiental seleccionadas fueron: el sexo, la edad y la edad de inicio de consumo de alcohol, para un total de 28 atributos. Con MDR se evaluó todas las interacciones de dos y tres atributos que incluían tanto variables genéticas como ambientales ajustadas por sexo, edad y edad de inicio del consumo como variables de confusión. En las figuras 2-1 y 2-2 se presentan el dendograma y los gráficos circulares basados en entropía, en donde se muestran la interacción entre las variantes génicas y ambientales. La línea roja muestra un efecto de interacción sinérgico fuerte entre los marcadores SNCA (rs2301134) y IFNGR1 (rs2234711) en los tres modelos presentados; de igual forma los marcadores SNCA (rs2619363) y MIF (rs893482429) presentan una fuerte interacción en el modelo ajustado por sexo y edad de inicio de consumo. Esto nos indica que combinando estos marcadores en una sola variable nos proporciona más información que considerándolos simplemente en un modelo lineal y/o aditivo; poseen odds ratio de 20 y 13, respectivamente con un intervalo de confianza adecuado y valores P significativos (tabla 2-14). Por otro lado, las líneas amarillas muestran una interacción moderada entre los marcadores (SNCA rs230113 y iNOS rs2779248), (IFNGR1 rs121913171 y SNCA rs230113) y la línea verde nos indica redundancia entre los marcadores IFNAR1 rs2850015 e iNOS rs2779248. Con estos resultados consideramos que estos tres genes: SNCA, IFNGR1 y MIF son un objetivo interesante para continuar con los siguientes ensayos de este estudio.

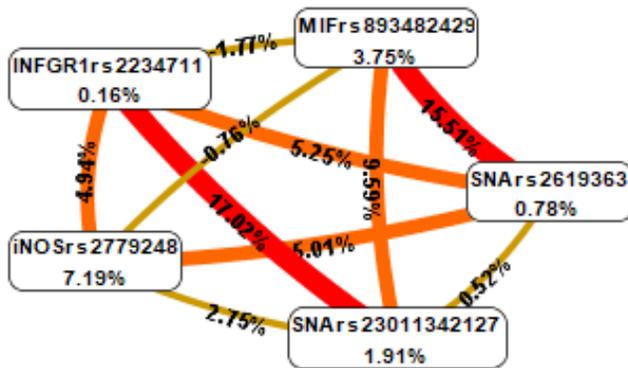
El MDR identificó como mejores modelos de predicción la interacción entre los SNV's de los genes: SNCA (rs2301134), iNOS rs2779248 y IFNGR1(rs2234711) en modelo ajustado por edad; los SNV's de los genes: SNCA (rs2619363) y MIF (rs893482429) en el modelo ajustado por sexo y los SNV's de los genes: SNCA-rs2301134, iNOS-rs2779248 e IFNGR1-rs2234711 en el modelo ajustado por edad de inicio, con una precisión del 69%, 67% y 71 % respectivamente con una

significancia de $p < 0,0001$ y una validación cruzada de 6/10, 7/10 y 7/10 respectivamente (ver tabla 2-14).

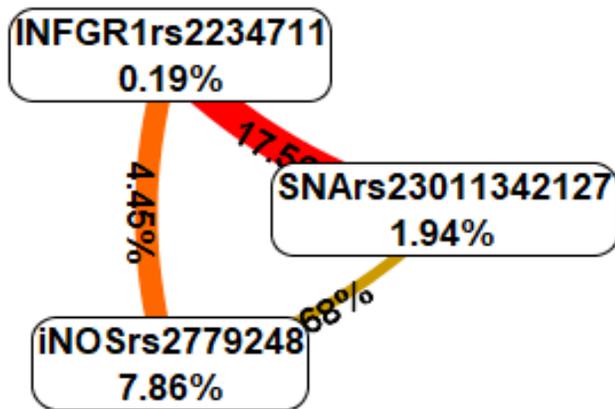
Tabla 2-14 Características del modelo de interacciones gen-gen, gen-medio ambiente asociado con susceptibilidad a la alcohol-dependencia, ajustado por sexo, edad y edad de inicio de consumo que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Modelo (uno, dos y tres factores)	Precisión de equilibrio de entrenamiento	Prueba de precisión de equilibrio	Sensibilidad	Especificidad	Coherencia de validación cruzada	OR, CI	Valor P
Ajustado por sexo							
iNOS rs2779248	0,6485	0,6142	0,6176	0,6786	9/10	3,4103 (1,9425-5,987)	0,0001
SNCA rs2619363, MIF rs893482429	0,7608	0,6704	0,6765	0,8304	6/10	10,2344 (5,3715-19,5001)	< 0,0001
SNCA rs2301134 iNOS rs2779248, IFNGR1 rs2234711	0,8186	0,6605	0,6765	0,9464	6/10	36,9394 (14,7035-92,8023)	< 0,0001
Ajustado por edad							
iNOS rs2779248	0,6553	0,6359	0,6226	0,687	10/10	3,6208 (2,0757-6,3161)	< 0,0001
SNCA rs2301134, IFNGR1 rs2234711	0,7622	0,6692	0,7075	0,800	5/10	9,6774 (5,2079-17,9828)	< 0,0001
SNCA rs2301134, iNOS rs2779248, IFNGR1 rs2234711	0,8198	0,6997	0,7925	0,8248	7/10	19,2919 (9,7725-38,0842)	< 0,0001
Ajustado por edad de inicio de consumo							
iNOS rs2779248	0,6522	0,6332	0,6111	0,6923	10/10	3,5357 (2,0375-6,1356)	< 0,0001
SNCA	0,7619	0,6887	0,6852	0,8291	6/10	10,5559	<

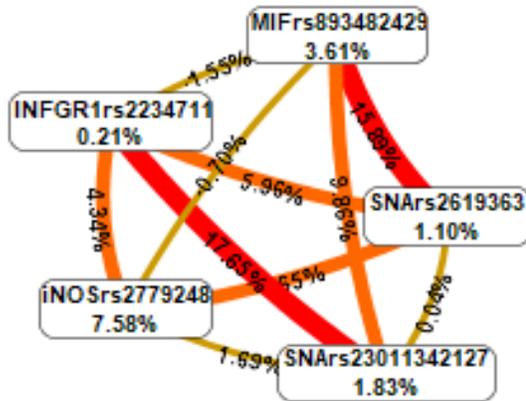
rs2619363, MIF rs893482429						(5,6234- 19,8149)	0,0001
SNCA rs2301134, iNOS rs2779248, INFGR1 rs2234711	0,8174	0,7108	0,787	0,8376	7/10	19,0618 (9,7199- 37,3821)	< 0,0001



a



b



C

Figura 2-1 Gráfico circular basado en entropía de interacciones gen-gen en población de individuos con uso problemático del alcohol ajustado por sexo (a), edad (b) y edad de inicio de consumo de alcohol (c).

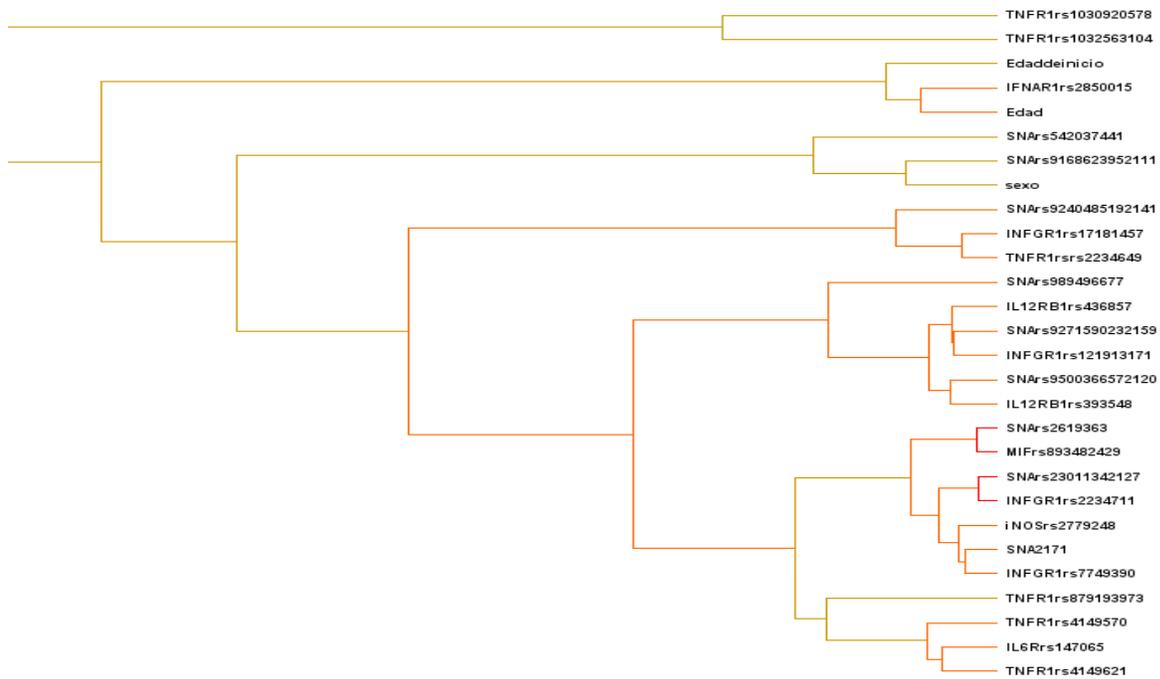
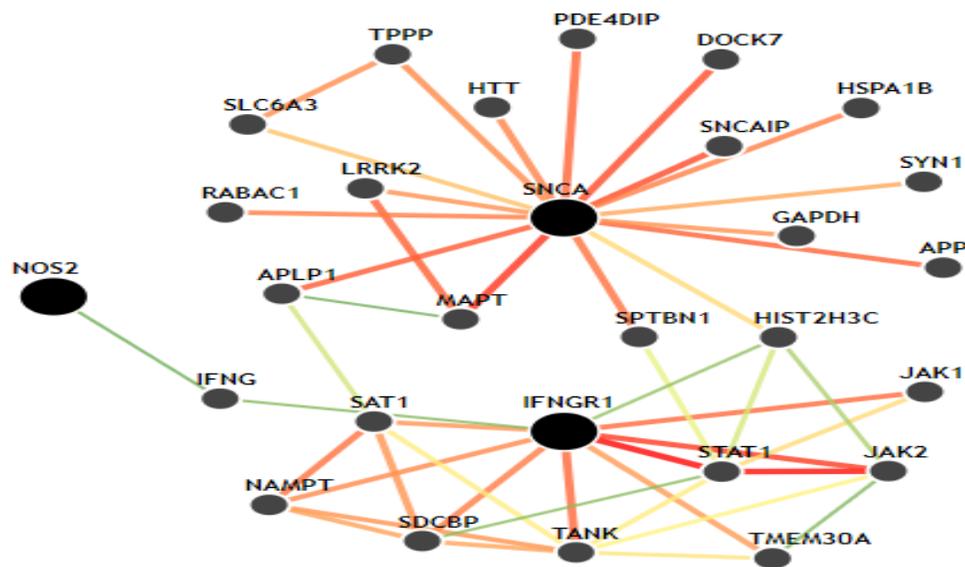


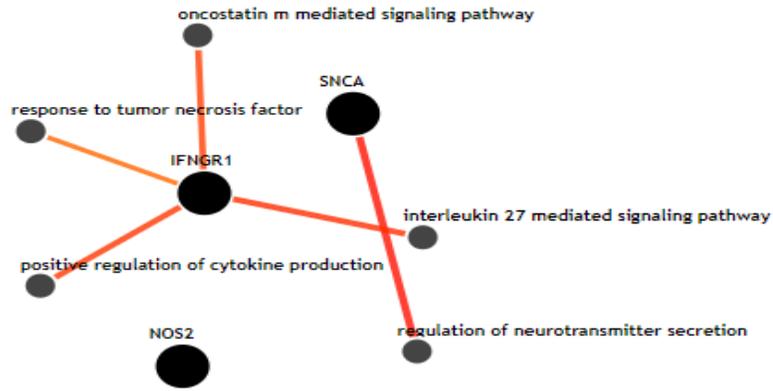
Figura 2-2 Dendrograma de interacciones de marcadores de genes seleccionados y atributos ambientales con mayor porcentaje de interacción en población con uso problemático del alcohol.

Para determinar el significado biológico de nuestros hallazgos empleamos la herramienta bioinformática IMP (Integrative Multi-species Prediction) (161). En la herramienta se introducen los genes que interactúan, de acuerdo con nuestros hallazgos descritos en el apartado anterior, arrojándonos una lista de procesos biológicos predichos para los genes en consulta y una red con genes que se predice que están relacionados funcionalmente con ellos. Los genes interactuantes obtenidos en este análisis participan en las vías de regulación y producción de citoquinas y neurotransmisores (ver figura 2-3).

De la red resultante destacan las proteínas STAT que están asociadas a receptores que al activarse, las fosforilan, se translocan al núcleo y actúan como factores de transcripción. STAT 1 puede ser activado por la vía de señalización del $INF\gamma$ e IL6(182). Las proteínas MAPT, son moléculas Tau asociadas al ensamblaje de microtúbulos en las neuronas y esenciales en el mantenimiento de la estructura de estas células y el transporte de materiales (183).



A)



B)

Figura 2-3 Red genética funcional para las proteínas SNCA, IFNGR1, MIF e iNOS2. Solo genes (A) y vías participantes (B).

3 Capítulo 3

3.1 OBJETIVO 2:

Determinar si hay diferencia de expresión génica de genes candidatos de respuesta inflamatoria relacionados con el uso problemático del alcohol cuando se comparan muestras de controles y casos.

3.2 INTRODUCCIÓN:

Para dar cumplimiento a este objetivo se empleó la variante de la técnica de PCR llamada qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real. En esta técnica se hace un seguimiento en tiempo real al aumento del cADN mediante la medición del aumento en la fluorescencia a medida que se intercala un agente fluorescente al material genético en crecimiento. Mediante esta medición se puede determinar la cantidad relativa del gen de interés expresado (ARNm) presente en la muestra inicialmente. Particularmente se empleó la cuantificación relativa donde se mide los niveles de expresión del gen de interés con respecto a un gen de referencia o calibrador. La medición de ARNm se realizó en células mononucleares de sangre obtenidas por gradiente de ficoll.

Además, se cuantifico la expresión de proteína en plasma de sangre periférica mediante la técnica de ELISA, el cual se realizó con el objetivo de evidenciar el siguiente nivel de la expresión génica, es decir la expresión en forma proteica. Recordemos que la prueba de ELISA es un inmuno-ensayo que emplea un anticuerpo con el fin de determinar y/o cuantificar una proteína determinada en una muestra líquida. Es conocida la correspondencia entre la medición de la

expresión génica en forma de ARNm y la proteica, aunque pueden encontrarse no coincidencias que se pueden explicar por otros mecanismos de regulación en la expresión de los genes y/o la procedencia de las muestras (76).

3.3 METODOLOGÍA:

3.3.1 ESTUDIO DE LA EXPRESION GENICA

Una alícuota de las muestras de sangre periférica del grupo de pacientes y controles, recolectadas durante el periodo de estudio fueron procesadas inmediatamente después de la toma de muestras para la obtención de las células mononucleares (PBMC) y a éstas últimas se les extrajo el ARN total. Este procedimiento de gradiente de densidad se llevó a cabo utilizando el reactivo Histopaque-1077 siguiendo las indicaciones del fabricante (Sigma-Aldrich) con ajustes menores (184). El método consistió en la adición de 3 mL del reactivo a un tubo Falcon de 15 mL, al que posteriormente se le agregó 3 mL de la muestra de sangre periférica teniendo cuidado de no generar ningún tipo de mezcla. Los tubos se centrifugaron con rotor basculante a ± 2.200 rpm por 30-40 min, para obtener el gradiente de densidad en el que las células mononucleares estaban representadas por la fase opaca ubicada entre el reactivo y el plasma (se usó centrifuga sin freno).

Utilizando una pipeta de Pasteur se traspasó el pellet de células mononucleares a un segundo tubo de 15 mL, al cual se le adicionó 10 mL de PBS 1X, con el fin de realizar una serie de lavados para eliminar trazas del reactivo y de otros componentes de la sangre. El contenido del tubo se mezcló por inversión y seguidamente se centrifugó a ± 2.200 rpm por 10 min, luego de lo cual se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos. El paso anterior se repitió dos veces, adicionando cada vez 5 mL de PBS 1X seguido de centrifugación de 2200

rpm, tras lo cual de forma inmediata se tomó el pellet de células con una mínima cantidad de PBS 1X residual y se conservó a -80°C para la posterior extracción del ARN total.

3.3.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN total se realizó empleando el reactivo RiboZol™ RNA Extraction Reagents siguiendo las indicaciones del fabricante (AMRESCO-Sigma-Aldrich, Germany). El procedimiento se desarrolló en un área especial del laboratorio destinada para tal fin, haciendo uso de implementos descontaminados con el reactivo *RNase Away* (Thermo Fischer Scientific, USA). El protocolo se basa en los siguientes pasos: Al pellet de células obtenidas en el paso anterior se le añadió un mL de RiboZol y 200 uL de cloroformo y se agito fuertemente hasta deshacer el pellet, se dejó en reposo, mínimo por tres minutos. Luego se centrifugaron los tubos a 10.000 g por 30 minutos a 4°C . Después de la centrifugación se forman dos fases, una inferior que es la fase orgánica, la cual se descartó; y la superior que es la acuosa, se tomó y traspasó a otro tubo eppendorf al cual se le añadieron 500 uL de isopropanol dejándolo a -80°C toda la noche con el fin que precipite el ARN total. Al cabo del tiempo, se centrifugaron los tubos a 10.000 g por 30 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y al pellet se le añadió un mL de etanol al 70% preparado con agua libre de nucleasas y se volvió a centrifugar a 10.000 g por 15 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y secaron las muestras en baño seco a 50°C . Con el fin de mantener la integridad del ARN, éste se resuspendió con 30 uL de en agua libre de RNAsas y se almacenó a -80°C hasta los posteriores análisis. La cantidad y calidad del ARN obtenido fue evaluado por medio de métodos espectrofotométricos y electroforéticos, respectivamente. Un μl del ARN total obtenido se cuantifico en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000 o NanoVue Plus) poniendo especial atención a la relación 260/280 como criterio de pureza que debería ser $> \text{ó} = \text{a } 1,8$. Se realizaron electroforesis en agarosa con buffer de

carga que contenía urea 6M, los geles fueron teñidos con SYBR safe donde se visualizó las bandas del ARN ribosomal 28S y 18S, se realizó el respectivo registro fotográfico. La cantidad restante de extracto fue almacenada a -80°C hasta la realización del siguiente procedimiento.

3.3.3 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Antes de comenzar con la RT, a 8 uL del ARN total obtenido de cada muestra (resuspendido en agua libre de RNAsas) se trató con un uL de DNAsa I en buffer 10X First Strand (1ul, en un volumen total de 10ul) e incubó durante una hora a 37°C, esto con el fin de eliminar posible contaminación de ADN.

La transcripción reversa se realizó utilizando el producto High Capacity cADN Reverse Transcription Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fischer Scientific, USA). Para la reacción se preparó una solución RT (Ver Tabla 3-1) de la cual, luego de una homogenización corta en una minicentrífuga (spin), se transfirió 10 µl a un tubo de 0,2 mL el cual se mantuvo en hielo. Seguidamente se adicionó 10 µl de ARN total, este último con una concentración de 200ng/µl con una relación 260/280 \geq 1.8, colocando un volumen máximo por reacción de 13.2µl, en este último caso sin necesidad de adicionar agua. Una vez la mezcla fue homogenizada, el tubo se cargó en un termociclador Bio-Rad T100 programado con las siguientes condiciones: a) 25°C x 10 min, b) 37°C x 120 min, c) 85°C x 5 min y d) 4°C x ∞. Finalmente, luego del proceso de termociclado, la muestra de cADN obtenida fue almacenada a -20°C hasta su uso posterior.

Tabla 3-1 Componentes de la solución “máster mix” para la realización de la transcripción reversa (RT)

Componente de la mezcla de reacción	Volumen por reacción (µl)
Búfer RT 10X	2,0
dNTPs 25X (10 mM)	0,8
Cebadores 10X (Random primers)	2,0
Enzima (Transcriptasa reversa)	1,0
Inhibidor de RNasas	1,0
Agua libre de nucleasas	3,2
Volumen total por reacción	10,0

3.3.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA-qPCR

Este ensayo fue realizado con el objetivo de determinar de manera indirecta la cantidad de ARNm de un gen en particular en la muestra, y determinar la expresión génica; para esto se tuvo en cuenta el ciclo de cuantificación (Ct o Cq), dónde es emitida la fluorescencia por encima del valor umbral y el cual es inversamente proporcional a la concentración de cADN presente.

Para realizar la qRT-PCR, se diseñaron primer's para el cADN obtenido de los ARN mensajeros (ARNm) de siete genes seleccionados de los resultados del estudio de SNV's, haplotipos y epistasis, y que presentaron diferencias y se encontraban con frecuencias alélicas y/o haplotípicas superiores al 1 %. Nos inclinamos por aquellos genes que poseían polimorfismos en las regiones promotoras y pertenecen a las vías involucradas en la manifestación del fenotipo alcohólico en genes de respuesta inflamatoria. Se estudiaron solamente los genes que está comprobado se expresan en células blancas sanguíneas. El ARN total extraído de las muestras fue retro transcripto a cADN y, éste último amplificado y cuantificado en una reacción de RT-PCR usando un agente intercalante llamado SYBR safe. La RT-PCR se realizó por triplicado para cada muestra, se usó el gen de la GAPDH como gen de referencia y control positivo de

la PCR. Las condiciones de la RT-PCR fueron establecidas en el procedimiento de estandarización previo al ensayo (fase pre-experimental). Para la cuantificación, se midió en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos (SYBR®safe) que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR en tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los programas de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN iniciales, de forma que, en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores. El método de cuantificación que se empleó fue midiendo el $\Delta\Delta C_t$, en el que se comparan directamente los C_t s del gen testado y del gen de referencia (ΔC_t) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔC_t de las muestras experimentales con respecto a la muestra calibradora (185). Para medir la expresión génica relativa se seleccionó como gen normalizador GAPDH y de muestra calibradora interplaca se empleó una mezcla en iguales proporciones de cADN de controles y casos con una concentración de material genético de 1 ng/uL. Para calcular la tasa de expresión se empleó la siguiente ecuación:

$$Tasa\ de\ expresión = \frac{E_T(C_{qT}^{Cal} - C_{qT})}{E_R(C_{qR}^{Cal} - C_{qR})}$$

Ecuación 3-1. Cálculo de la tasa de expresión cuando se usa un gen de referencia (186) en donde: E_T : Eficiencia de amplificación del gen objetivo; E_R : eficiencia de amplificación del gen de referencia; C_{qT} : ciclo de cuantificación del gen objetivo; C_{qR} : ciclo de cuantificación del gen de referencia; Cal: muestra calibradora interplaca.

La expresión de mRNA de los genes seleccionados en las células monomorfonucleares se presentó como la media \pm SD (desviación estándar) de la tasa de expresión y para su comparación entre casos y controles se empleó el estadístico no paramétrico llamado prueba U de Mann-Whitney. Todos los cálculos se ejecutaron con el programa SPSS versión 23 (157).

Tabla 3-2 Características de los primer´s diseñados para realizar la qPCR y determinar la tasa de expresión de los ARNm de los genes seleccionados.

N.	Gen	Primer 1	Tm	% GC	Tamaño del amplificado
1	IL-6R	F:GCACTTGCTGGTGGATGTTTC	59	55.	128
		R:AGAGCACAGCCTTTGTCGTC	60	55	
2	NOS2	F:TCAGCTCAAGAGCCAGAAGC	60	55	144
		R:GCAGCTTTAACCCCTCCTGT	59	55	
3	IFNGR1	F:GTGACGAGATTCAGTGCCAG	58	55	175
		R:GCAGCAACAACCTGGAATCCAAA	60	45	
4	MIF	F:AGAACCGCTCCTACAGCAAG	59	55	130
		R:GCGAAGGTGGAGTTGTTCCA	60	55	
5	TNFR1	F:GTTGTGCCTACCCAGATTG	58	55	175
		R:CGATTTCCCACAAACAATGGAG	58	45	
6	SNCA	F:GCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGC	68	65	133
		R:CTGTTGCCACACCATGCACCACTCC	68	60	
7	GAPDH	F:CACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA	64	50	131
		R:CCTTGACGGTGCCATGGAATTTGC	65	54	

Previo al montaje de este ensayo se realizó una fase de pre-experimentación para evaluar varios parámetros indispensables para la validación de los resultados y con el propósito de estandarizar el ensayo de qPCR. Se realizaron las siguientes pruebas previas para determinar: concentración óptima de los primer´s, las condiciones de especificidad de unión de los primer´s, la eficiencia de amplificación y el rango dinámico para cada qPCR. Para esta fase de estandarización se empleó muestras de uno de los miembros del grupo de investigación, un control y un caso tomados al azar. Los genes NOS2 y IFNGR1 presentaron dificultades y se tomó la decisión de no incluirlos en este documento.

Para evaluar la eficiencia y el rango dinámico se realizaron diluciones seriadas del cADN (1/10, 1/100, 1/1000) encontrando que en el rango de concentraciones entre 0.25 y 12.5 ng/uL el ensayo conserva linealidad, por tanto el protocolo funciona correctamente para todos los genes. La eficiencia de los ensayos para cada gen fueron las siguientes: IL6R1:2,08; TNFR1: 2,08; MIF: 1,83; SNCA: 2.18 y GADPH: 1.98. Valores que están en los rangos aceptados en los protocolos de ejecución de qPCR internacionales. Para la determinación de la concentración óptima de los primer´s se emplearon tres valores: 0,5; 0,25 (recomendada por los fabricantes del kit de qPCR) y 0,125 uM. Los ensayos nos mostraron que la concentración de primer´s de 0,125 uM generaba curvas de fusión con un único pico y eficiencias en el rango apropiado (1,8-2,2). La especificidad se obtuvo con la selección de temperatura de hibridación de los primer´s mediante gradiente de temperatura en donde se observó un único y bien definido pico de amplificación.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler® 96 con el kit para qPCR Luna ® Universal qPCR Máster Mix. La composición del ensayo de qPCR fue establecida y validada por nuestro grupo de investigación (ver tabla 3-3).

Tabla 3-3 Composición de la mezcla para qPCR preparada con el kit Luna ® Universal qPCR Máster Mix

Componente	Volumen por reacción (uL)
qPCR máster mix (10X)	1
Primer F (10uM)	0.125
Primer R (10 uM)	0.125
cADN	1-3*
Agua desionizada	Variable
Volumen total	10

*La concentración final para el cADN utilizada fue de 1 ng/uL que se encuentra en el rango dinámico establecido previamente.

Para el montaje de la reacción de qPCR en el termociclador fueron utilizadas las siguientes condiciones: 1) 1 ciclo de desnaturalización inicial (95°C, 300 segundos) 2) 45 ciclos. Desnaturalización (95°C, 15 segundos), hibridación y extensión (65°C, 30 segundos) 3) 1 ciclo de melting (95°C, 10 segundos, 65 °C por 60 segundos y 97 °C por un segundo) y un ciclo final de enfriamiento a 37 °C.

3.3.5 ENSAYO DE ELISA

Se analizaron cuatro productos proteicos, alfa sinucleína (SNCA) mediante el kit human ELISA BioVision Incorporated; el receptor 1 del factor de necrosis tumoral mediante el kit TNFRSF1A de AVIVA SYSTEMS; la proteína MIF mediante el kit MIF ELISA (HUMAN) de AVIVA SYSTEMS y el receptor 1 de interleuquina 6 mediante el kit IL6R ELISA (HUMAN) de AVIVA SYSTEMS. Para todos los ensayos, tanto en controles como casos se utilizó el plasma obtenido mediante el gradiente en ficoll realizado para el aislamiento de células mononucleares en la obtención del ARN total. El plasma así obtenido se conservó a -80°C hasta el momento de ejecución del ensayo de ELISA.

El desarrollo de los ensayos de ELISA fue ejecutado de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes de cada kit. Los patrones de concentración se prepararon en diluciones seriadas de volumen de 300 uL con concentraciones 0 a 500 pg/mL para TNFRSF1A, 0 a 1000 pg/mL para SNCA; 0 a 10.000 pg/mL para MIF y 0 a 4.000 pg/mL para IL6R. Estos patrones se realizaron por duplicado. De igual forma, se realizó un pre-ensayo con diluciones 1:100; 1:10, 1:2 de unas muestras de los controles y casos seleccionadas al azar con el fin de establecer las diluciones adecuadas para obtener absorbancias próximas al rango obtenido para los patrones. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Se empleó el equipo lavador de microplacas de la casa comercial BioTek ELx50. Los pozos de las placas se lavaron dos veces con el buffer de lavado previo a la

colocación de los estándares y muestras. En cada pozo de las placas se colocó 100 uL de la dilución del estándar y de las muestras por una hora y media a 37 °C. Al término de la incubación se descartó el sobrenadante y se dejó secar completamente. Se adiciono el anticuerpo biotinilado por una hora a 37 °C. Al cabo del tiempo se desechó el sobrenadante y se lavó la placa tres veces con el buffer de lavado y finalmente se dejó reposar por tres minutos y se secó totalmente por aspirado. Se adiciono 100 uL de la solución de trabajo (SABC) por 30 minutos a 37 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó por cinco veces con buffer de lavado. Se adiciono 90 uL del sustrato TMB incubando en la oscuridad por un intervalo de 15 a 30 minutos. Se colocó la solución de parada, 50 uL, y a los 20 minutos se hizo la lectura a 450 nm de longitud de onda en un lector de placas de ELISA multiskan FC de thermo Scientific, USA.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó con la construcción de una curva de calibración previa con los datos obtenidos de los patrones. Como se indicó previamente se elaboró una batería de patrones suficiente para cubrir un rango que incluía la concentración esperada en las muestras desconocidas. La curva se ajustó mediante la regresión con mínimos cuadrados. La expresión de ARNm y de proteínas seleccionadas en plasma se presentó como la media +/- SD (desviación estándar) de la concentración determinada y para la comparación entre casos y controles se empleó la prueba paramétrica de t para igualdad de medias o el estadístico no paramétrico prueba U de Mann-Whitney. Para determinar la distribución de los datos, se realizó la prueba de Shapiro wilk, cuando el análisis era menos a 50 personas. En los casos donde no se presentó una distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas. También fue realizada la prueba de Levene para la homocedasticidad de las varianzas ($p > 0.05$). Si el resultado daba normalidad y homocedasticidad, se realizó la prueba ANOVA de dos factores, con test post hoc de Bonferroni cuando era necesario. Todos los cálculos se ejecutaron con el programa SPSS versión 23 (157).

3.4 RESULTADOS:

3.4.1 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ARNm

La ejecución adecuada de la qPCR y el análisis acertado de los resultados de expresión relativa de ARNm depende de numerosos factores, por ejemplo, la calidad del ARN total obtenido, de la selección adecuada del gen normalizador, que no debe mostrar diferencias entre los controles y casos. De la literatura y estudios propios (6,187,188) hemos seleccionado al gen GADPH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) como el más apropiado de referencia para este tipo de diseño experimental. Otro factor importante es la repetibilidad de los ensayos mediante replicas técnicas y biológicas. Se evaluaron los resultados del Ct por corrida y se sacó el promedio del triplicado montado. En ningún caso se evidenciaron resultados dentro del triplicado que requiriera un análisis particular. Además de los promedios de Ct de cada uno de los genes medidos y del gen normalizador en las muestras de controles, casos y calibradora (interplaca) se determinó los valores mínimos, máximos, cuartiles 1, 2 (mediana) y 3 y valores atípicos. Se identificó datos atípicos a 1,5 rangos intercuartílicos evidenciando hasta máximo tres valores atípicos en algunos de los genes estudiados, los cuales no fueron utilizados en los análisis. Los valores de Ct para el gen normalizador GADPH no presentaron diferencias significativas entre las placas y grupo de muestras. Se aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente (tabla 3-4). Para los grupos de datos con una distribución normal y una varianza homogénea se empleó la prueba de t para igualdad de medias, mientras para datos con distribución no normal y varianzas no iguales se aplicó la prueba estadística no paramétrica del U de Mann-Whitney. Se construyeron diagramas de caja con el propósito de visualizar más fácilmente diferencias entre los grupos o muestras objeto de análisis, se determinó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ en todos los casos.

Para determinar la tasa relativa de transcripción del ARNm debemos recordar, como se indicó en la metodología, la muestra de referencia consistió en un pool de cADN de controles y casos. En cada placa se corrieron las muestras de estudio: controles, casos y referencia con los primer's para los genes testeados y el gen calibrador, por triplicado. Cuando se analizan todos los individuos, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la expresión relativa de ARNm de los genes TNFR1 y MIF, según la prueba de comparaciones de medias su cambio fue hacia la baja en donde hubo una reducción de dos y 1,5 veces, respectivamente en cada gen, en los individuos con consumo problemático de alcohol (ver tabla 3-5 y figura 3-1). Con respecto al gen SNCA se observa una tendencia al aumento de expresión en individuos con uso problemático del alcohol (figura 3-3), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En la expresión del gen IL6R1 no hay diferencias estadísticamente significativas entre controles y casos. Cuando se realizó la comparación por sexo se observan resultados similares que, en la muestra general, en la expresión relativa de los genes MIF y TNFR1 disminuyeron significativamente, mientras en la transcripción del gen SNCA en hombres aumenta significativamente ($p=0,036$) de 0,7 a 1,6 veces, mientras en las mujeres no hay cambios estadísticamente significativos (Figura 3-2). Por último, en la expresión del ARNm del gen IL6R1 no se identificó ningún cambio significativo entre los grupos analizados (datos no se muestran).

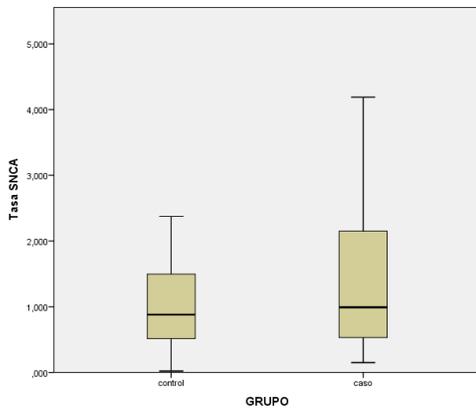
Tabla 3-4 Comparación de medias de transcripción relativa de ARNm de los genes SNCA, IL6R1, TNFR1 y MIF en células mononucleares de sangre periférica de controles y casos alcohol-dependientes y otros parámetros como distribución y varianza.

Gen	Distribución (Prueba Shapiro-Wilk) Valor P, n	Comparación de varianzas (Prueba de Levene) Valor P	Comparación de medias o medianas (\pm DS) (Prueba t o test de U de Mann-Whitney)	Valor P
SNCA n=50	Control: No Normal 0,043*; n=25	0,027*	1,02 \pm 0,74	0,193

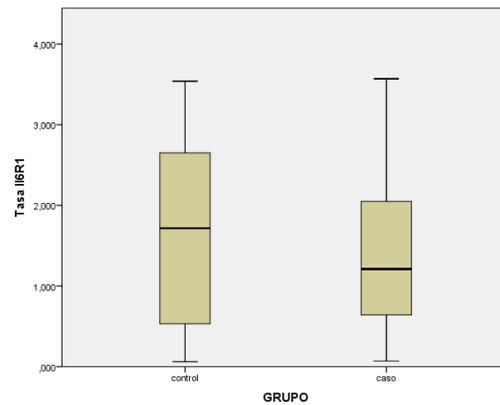
	Consumo problemático de Alcohol: No Normal 0,013*; n=25		1,42±1,17	
IL6R1 n=48	Control: Normal 0,465; n=25 Consumo problemático de Alcohol: Normal 0,319; n=23	0,178	1,64±1,10 1,39±0,92	0,403
TNFR1 n=48	Control: No Normal 0,043*; n=25 Consumo problemático de Alcohol: Normal 0,260; n=23	0,013*	0,99±0,065 0,53±0,36	0,007*
MIF n=50	Control: No Normal 0,005*; n=25 Consumo problemático de Alcohol: Normal 0,319; n=25	0,023*	1,39±0,63 0,92±0,43	0,004*

n=tamaño de la muestra

*diferencias estadísticamente significativas



A



B

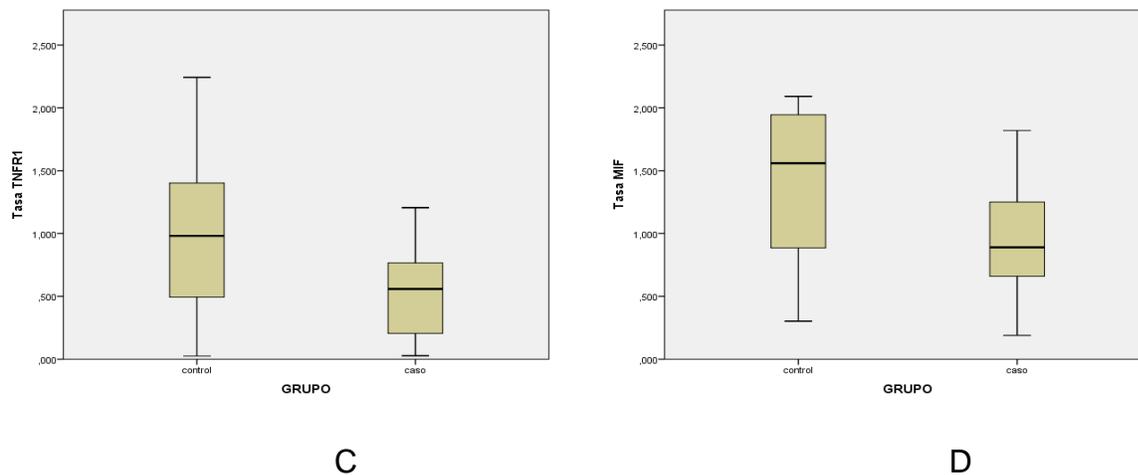


Figura 3-1 Expresión relativa de ARNm de SNCA (A), IL6R1 (B), TNFR1(C) y MIF(D) en células mononucleares de sangre periférica en controles y casos con consumo problemático de alcohol (gen calibrador: GADPH). Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea transversal que representa la mediana.

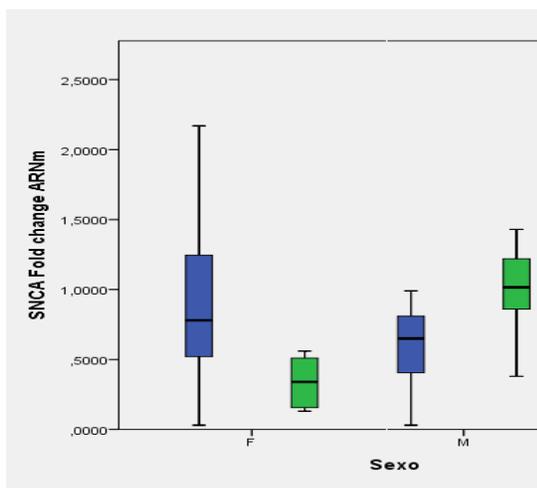
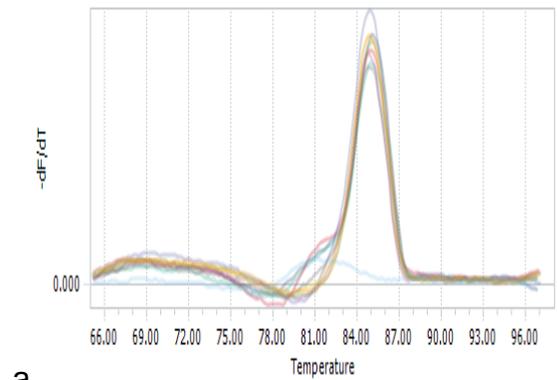
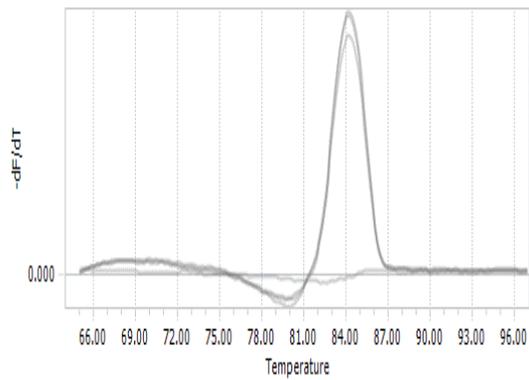


Figura 3-2 Expresión relativa de ARNm de SNCA en células mononucleares de sangre periférica en controles y casos con consumo problemático de alcohol (gen calibrador: GADPH) discriminados por sexo, donde F corresponde a mujeres y M a hombres. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea transversal que representa la mediana.

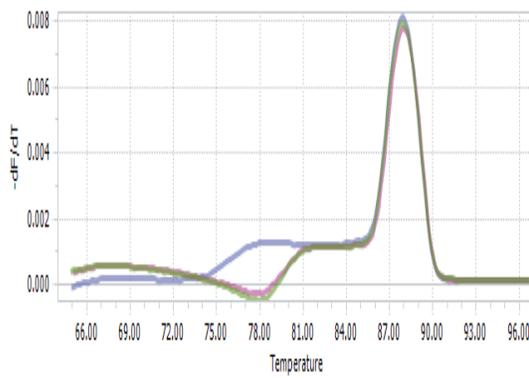
Para verificar la especificidad del ensayo se corrieron las curvas de temperaturas de fusión para los cinco genes (SNCA, TNFR1, IL6R1, MIF, GADPH) (figura 3-2)

donde se evidencia un único pico correspondiente al segmento esperado, corroborado seguidamente mediante electroforesis en gel de agarosa donde se observó una única banda (imágenes no presentadas).

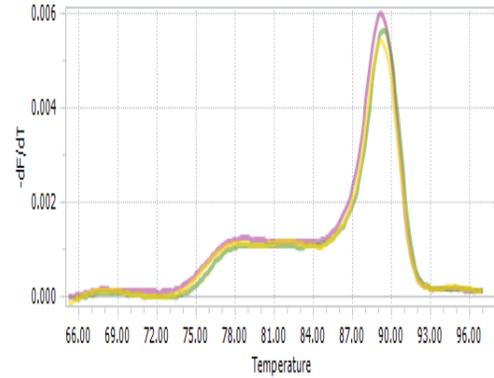


a

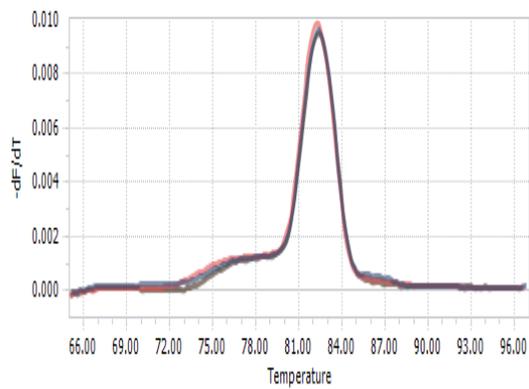
b



c



d



e

Figura 3-3 Curva de temperatura de fusión para amplificadas a partir de cADN obtenidos en el termociclador LigthCycler 96 para las muestras de sujetos control del estudio para los genes: SNCA (a), TNFR1 (b), IL6R1(c), MIF (d) y GADPH(e).

Una gran dificultad al utilizar el “fold change”, es decir las veces que cambia la tasa de transcripción como medida de la expresión de los genes es el sesgo y la posibilidad de valorar erróneamente la expresión relativa de un gen, pues dos genes pueden tener grandes diferencias de expresión, pero la relación de estas puede ser una pequeña proporción, por lo que recurrimos al logaritmo del fold change que graficado resulta ser más ilustrativo que la simple tasa de expresión relativa. Es así como valores positivos de este logaritmo indican que el gen se expresa más en el grupo referido y valores negativos indican que el gen se expresa menos. En la figura 3-3 podemos observar el cambio de expresión de SNCA al alza en individuos con consumo problemático de alcohol y el pronunciado cambio de expresión a la baja en TNFR1 y MIF y en menor proporción en IL6R1. Por otro lado, vale la pena recordar que los resultados obtenidos mediante la cuantificación relativa normalizada con un gen de referencia como GADPH con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ aporta información valiosa sobre el comportamiento aislado de cada gen, siendo importante remarcar que estos valores se corresponden con aumento o disminución relativos sobre el gen calibrador y no con la expresión absoluta de los genes testeados.

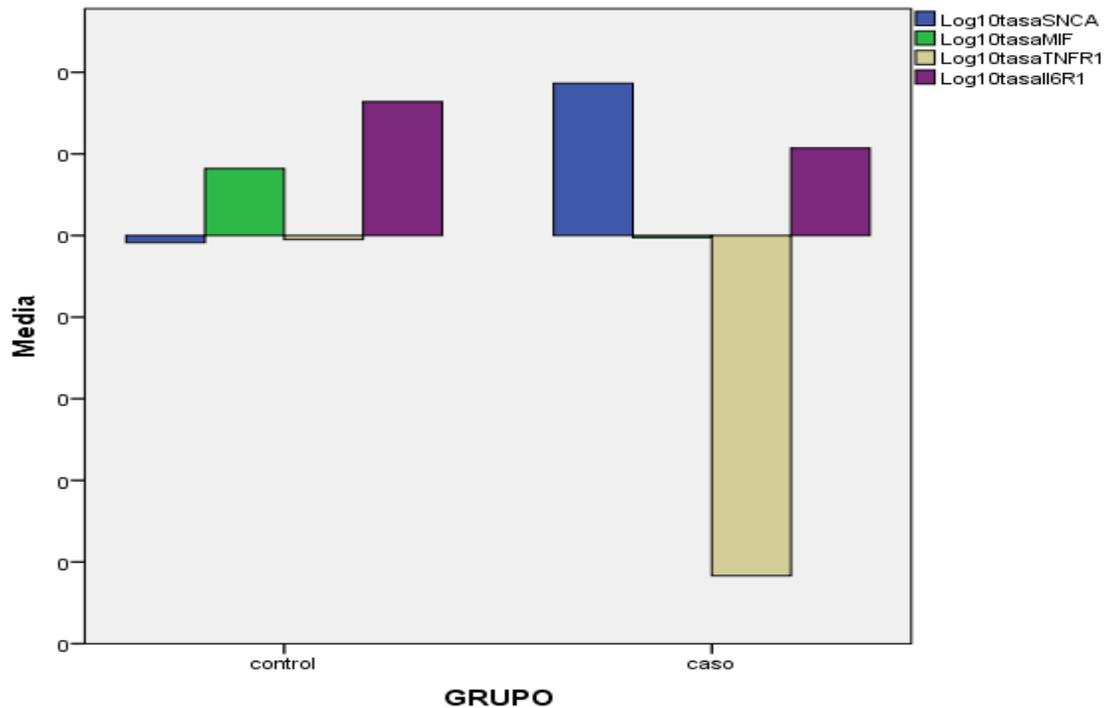


Figura 3-4 Logaritmo en base 10 de la transcripción relativa de ARNm de los genes seleccionados: SCNA (azul), MIF (verde), TNFR1 (beige) y IL6R1 (purpura) comparando casos y controles.

Al realizar el análisis de correlación entre las tasas de expresión de los genes en estudio entre los grupos: casos y controles, se puede evidenciar en los controles una relación lineal, positiva y fuerte entre la expresión de las parejas de genes con coeficiente de correlación (r) alto: TNFR1-IL6R1 ($r=0,819$), MIF-IL6R1($r=0,716$), TNFR1-SNCA ($r=0,563$), SNCA-IL6R1($r=0,586$), los cuales se reducen en todos los casos en más del 50 % al correlacionar dentro del grupo de casos de consumo problemático de alcohol. Lo anterior indica que hubo un cambio en la tasa de transcripción de uno de los genes en el grupo de casos que cambió la relación lineal fuerte que presentaban las dos variables al compararla en los controles. El coeficiente de correlación es alto tanto en controles como en casos para la expresión de ARNm de un par de genes: TNFR1-MIF con $r=0,694$ y $r=0,756$, respectivamente (ver tabla 3-5 y figura 3-4).

Tabla 3-5 Matriz de correlación entre las tasas de expresión relativa del ARNm de los genes de interés (SCNA, IL6R1, TNFR1 y MIF) en las muestras de los grupos control e individuos con consumo problemático (AD).

Genes de interés	Grupo	SCNA		IL6R1		TNFR1		MIF	
		Coefficiente de correlación	Valor P						
SCNA	Control	1	---	0,586	0,005*	0,563	0,008*	0,251	0,260
	AD	1	---	0,560	0,013*	0,228	0,308	0,364	0,088
IL6R1	Control	0,586	0,005*	1	---	0,819	0,000*	0,716	0,000*
	AD	0,560	0,013*	1	---	0,110	0,653	0,346	0,125
TNFR1	Control	0,563	0,008*	0,819	0,000*	1	---	0,694	0,000*
	AD	0,228	0,308	0,110	0,653	1	---	0,756	0,000*
MIF	Control	0,251	0,260	0,716	0,000*	0,694	0,000*	1	---
	AD	0,364	0,088	0,346	0,125	0,756	0,000*	1	---

*diferencias estadísticamente significativas

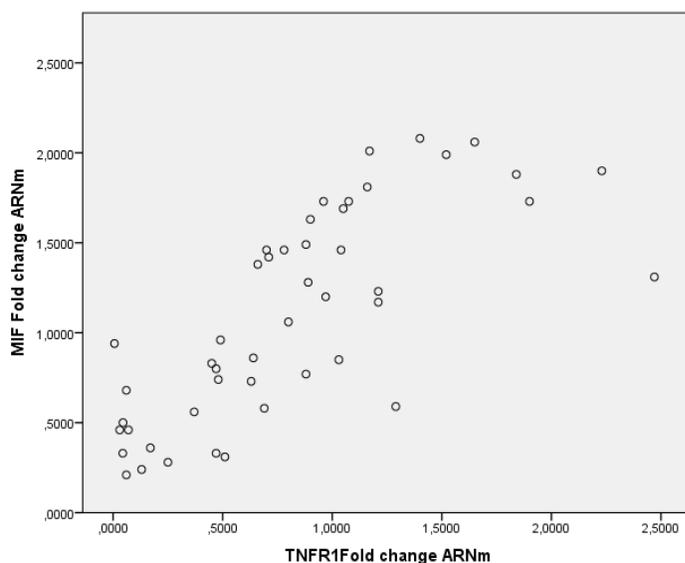


Figura 3-5 Diagrama de dispersión entre las variables de tasa de transcripción de los genes TNFR1 y MIF en controles e individuos con uso problemático del alcohol.

3.4.2 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

En la mayoría de los casos al comparar la expresión génica en forma de ARNm y proteínica, éstas coinciden en sus tendencias al alza, a la baja o de no cambio. En ocasiones se presentan eventos de regulación postranscripcionales y postransduccionales que alteran esta relación. Como se indicó en la metodología la concentración de proteínas en plasma sanguíneo de los participantes en el estudio se determinó mediante la técnica de ELISA. Se identificó datos atípicos a 1,5 rangos intercuartílicos, se evidenciaron entre 0 y tres valores atípicos por proteína estudiada, los cuales no fueron utilizados en los análisis. Se aplicaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Para el análisis de grupos de datos con una distribución normal y una varianza homogénea se empleó la prueba de t para igualdad de medias, mientras para datos con distribución no normal y varianzas no iguales se aplicó la prueba estadística no paramétrica del U de Mann-Whitney (Ver tabla 3-6). Se construyeron diagramas de caja con el propósito de visualizar más claramente las diferencias entre los grupos de muestras objeto de análisis, se determinó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ en todos los casos.

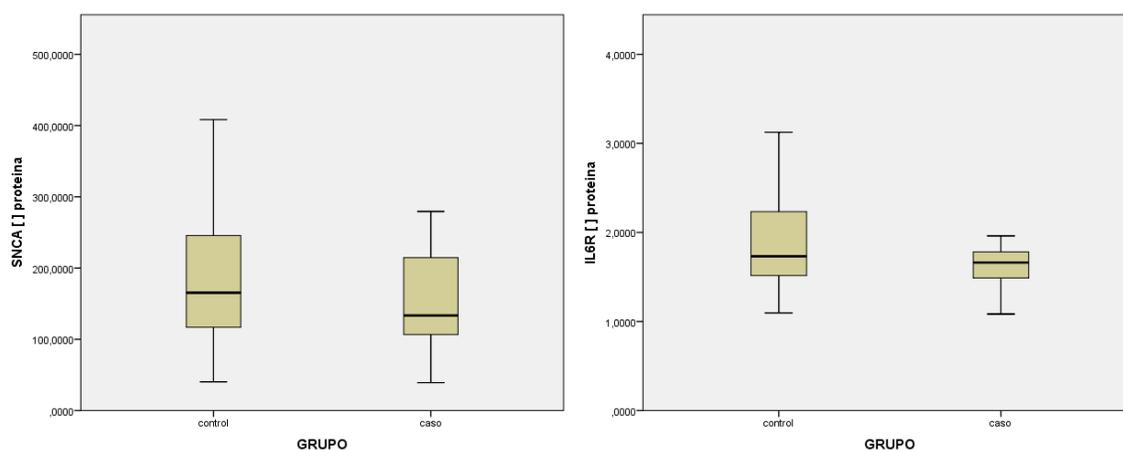
Al comparar la concentración de proteínas en plasma sanguíneo, en general no se evidencian diferencias en los factores proteicos SNCA, IL6R1 y TNFR1, mientras que MIF muestra una disminución de dos veces en individuos con uso problemático del alcohol ($P=0,001$), esto analizando las muestras sin ningún tipo de estratificación (tabla 3-6, Figura 3-4). Cuando se estratifica las muestras por sexo, en SNCA, IL6R1 y MIF se evidencian diferencias en hombres con una disminución mayor al 50% estadísticamente significativa de $P=0,014$; $0,002$ y $0,004$ respectivamente y en mujeres solo MIF muestra una disminución aproximadamente del 60 % ($P=0,021$) tal cual como en la muestra general (Figura 3-6).

Tabla 3-6 Comparación de medias de la concentración de proteína de SNCA, IL6R1, TNFR1 y MIF en plasma sanguíneo de controles y casos con uso problemático del alcohol.

Proteína	Distribución (Prueba Shapiro-Wilk) Valor P; n	Comparación de varianzas (Prueba Levene) de Valor P	Comparación de medias o medianas (pg/mL) (Prueba t o test de U de Mann-Whitney)	Valor P
SNCA n=59	Control: Normal 0,362; n=33 Alcohol: Normal 0,170; n=26	0,554	198,13±135,62 199,31±165,77	0,585
IL6R1 n=55	Control: Normal 0,123; n=30 Alcohol: Normal 0,559; n=25	0,010*	1,94±0,60 2,15±1,08	0,883
TNFR1 n=54	Control: Normal 0,435; n=30 Alcohol: Normal 0,066; n=24	0,035*	11,77±6,33 9,90±4,34	0,490
MIF n=52	Control: Normal 0,071; n=28 Alcohol: Normal 0,724; n=24	0,000*	8898,34±5342,38 4391,42±1659,75	0,001*

n=tamaño de la muestra

*diferencias estadísticamente significativas



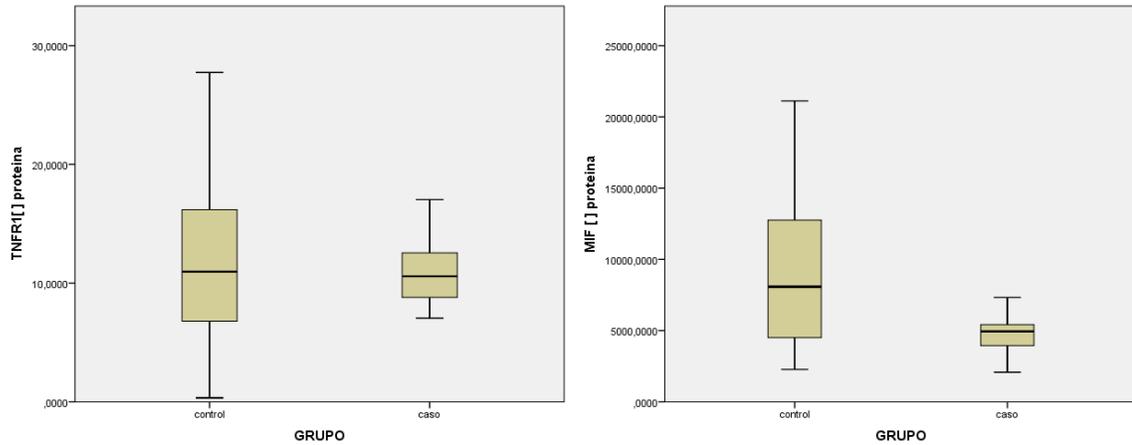
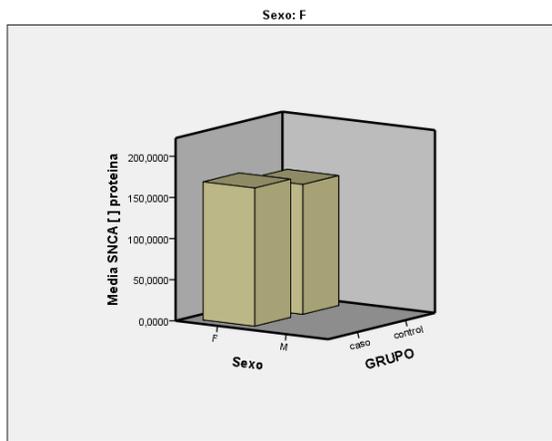
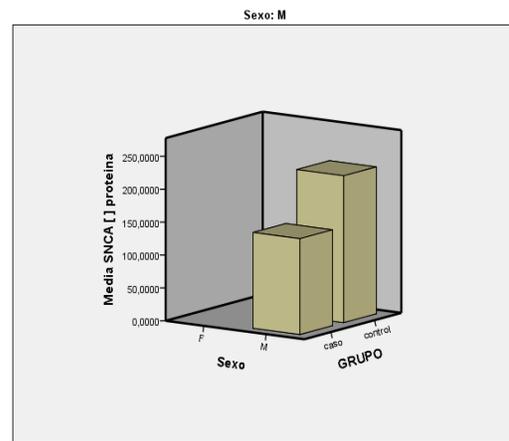


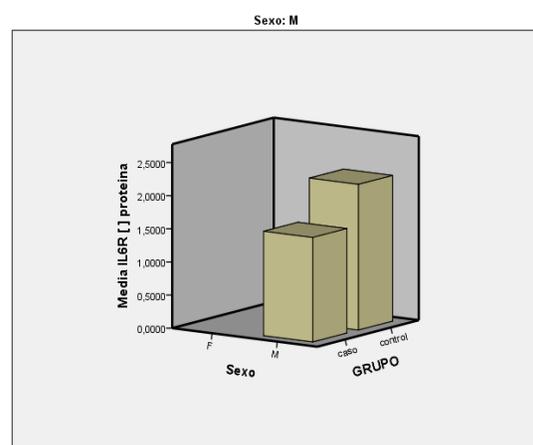
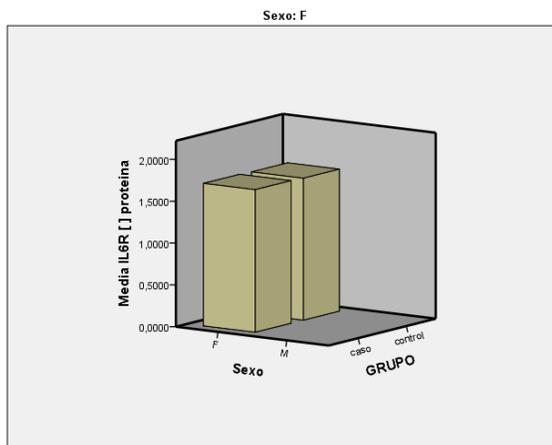
Figura 3-6 Concentración de proteínas (pg/mL) de SNCA (A), IL6R1 (B), TNFR1(C) y MIF(D) en plasma sanguíneo de controles y casos (individuos con uso problemático del alcohol). Los datos se presentan como un diagrama de cajas que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea transversal que representa la mediana.



a)



b)



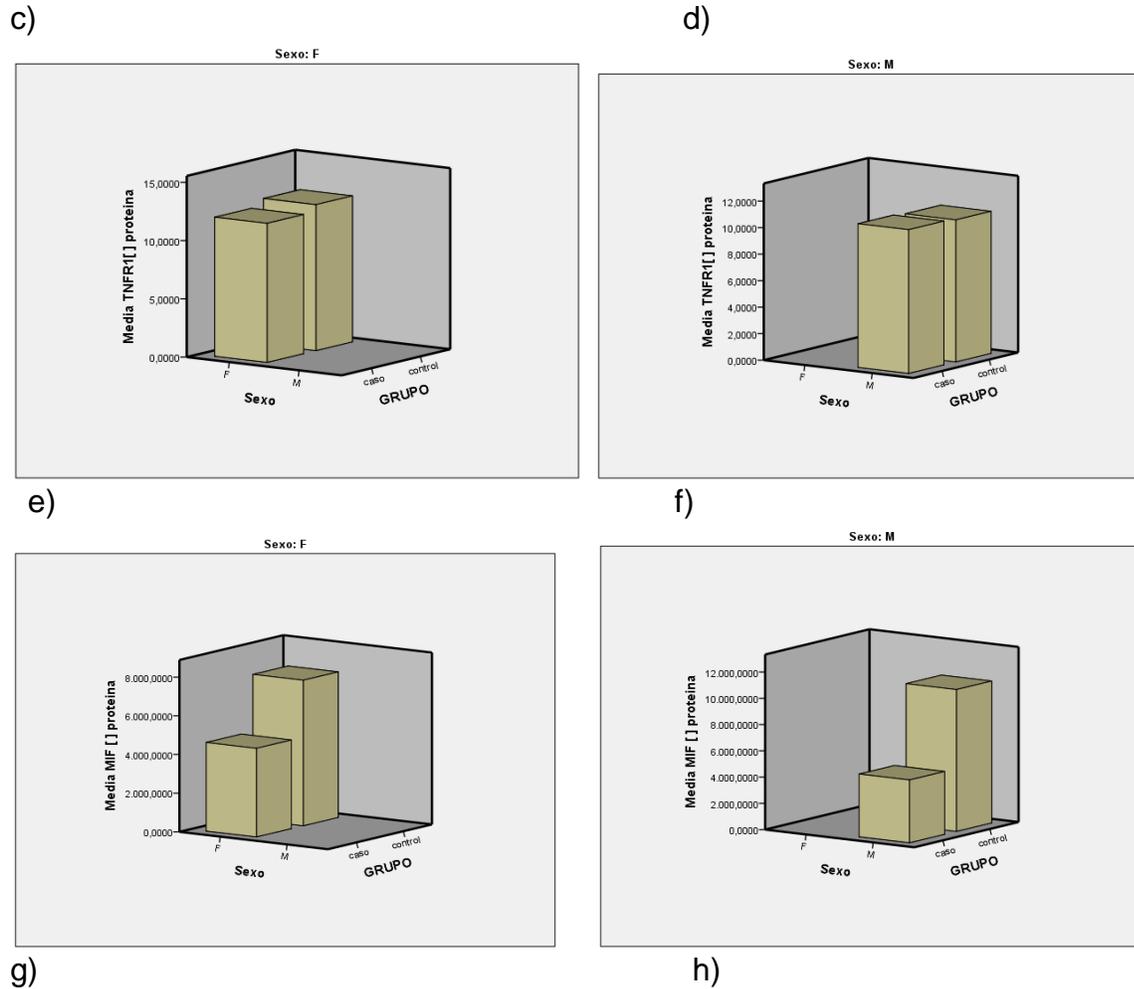


Figura 3-7 Concentración de proteínas (pg/mL) en plasma de controles y casos estratificados por sexo. Con la letra a (mujeres) y b (hombres) para SNCA; c (mujeres) y d (hombres) para IL6R1; e (mujeres) y f (hombres) para TNFR1 y g (mujeres) y h (hombres) para MIF.

Al realizar el análisis de correlación entre las variables de concentración de los factores proteicos (SNCA, IL6R1, TNFR1 y MIF) ninguno mostro coeficientes altos, por el contrario, estos índices eran cercanos a cero, lo que nos indica la ausencia de relación lineal entre estos factores. (Tabla 3-8).

Tabla 3-7 Matriz de correlación entre la concentración de proteína en plasma producto de la expresión de los genes de interés en las muestras de los grupos control y casos (consumo problemático de alcohol (AD)).

Genes de interés	Grupo	SCNA		IL6R1		TNFR1		MIF	
		Coefficiente de correlación	Valor P						
SCNA	Control	1	---	-0,275	0,156	-0,048	0,801	0,269	0,150
	AD	1	---	0,221	0,429	-0,082	0,746	0,007	0,976
IL6R1	Control	-0,275	0,156	1	---	0,065	0,743	0,008	0,968
	AD	0,221	0,429	1	---	-0,095	0,746	-0,123	0,933
TNFR1	Control	-0,048	0,801	0,065	0,743	1	---	-0,237	0,200
	AD	-0,082	0,746	-0,095	0,746	1	---	-0,189	0,426
MIF	Control	0,269	0,150	0,008	0,968	-0,237	0,200	1	---
	AD	0,007	0,976	-0,123	0,933	-0,189	0,426	1	---

*diferencias estadísticamente significativas

La asociación entre SNV's, expresión de mRNA y niveles proteicos en el conjunto de los cuatro genes para los grupos (control versus casos) a los que se les determinó estas variables no arroja diferencias significativas, datos que no se muestran.

3.5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde hace décadas se sabe que el consumo de alcohol ya sea agudo o crónico, causa cambios en la expresión génica, en forma de ARNm o de proteínas en todo el organismo y particularmente en tejidos específicos, principalmente hepático y nervioso(189). El consumo crónico de alcohol incrementa la excreción de nitrógeno con la concomitante pérdida de masa que puede ser de músculo esquelético o cardíaco, entre otros. También se presentan cambios cualitativos en los productos de la expresión proteica en el hígado, músculo y/o huesos (189). El sistema inmune no es ajeno a esta situación, la exposición aguda *in-vitro* al etanol

disminuye la producción en monocitos de citoquinas proinflamatorias IL1, IL6 y TNF- α y de este último biomarcador también en macrófagos. Por otro lado, la exposición prolongada al alcohol *in-vivo* se ha relacionado con una activación de células citotóxicas T (LTC) y asesinas naturales (NK) y la elevación de las citoquinas que este tipo de células producen. De igual forma, los bebedores crónicos muestran niveles más altos de citoquinas proinflamatorias: IL-6, IL-7, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ que los controles. El gran consumo de alcohol aumenta la presentación de infecciones y una pobre respuesta a las mismas con alteración en los niveles de citoquinas circulantes, siendo éstas excelentes candidatas a biomarcador del alcoholismo, aunque no se ha logrado un consenso sobre sus patrones de presentación (104).

Determinar la expresión de proteínas en un tejido específico nos muestra la cantidad real que de ellas se han sintetizado en ese momento concreto de la vida de ese organismo en estudio, en ese tejido particular, mientras la estimación de la tasa relativa de transcripción en forma de mRNA nos muestra la probabilidad de cuanta proteína será sintetizada en un futuro cercano con relación a un gen de referencia. La mayoría de ensayos de laboratorio confirman la correlación entre datos de expresión de mRNA y sus correspondientes proteínas, siendo estos últimos más informativos (190). En este trabajo encontramos que las tasas de transcripción de los genes SNCA y IL6R1 no variaron al comparar los individuos con uso problemático del alcohol con los controles, aunque en SNCA se observa una tendencia al aumento de la transcripción en individuos con uso problemático del alcohol sin diferencias estadísticamente significativas, aunque si hay diferencias al comparar los hombres, se muestra un aumento en los casos. Diversos autores han evidenciado tanto aumento como disminución en las concentraciones de SNCA en individuos con uso problemático del alcohol y alcoholismo, estos resultados se podrían explicar analizando el diseño del estudio, dependiendo de la correcta asignación de la fase en el proceso de

adicción en que se encuentra el paciente, el tejido de medición, la edad de inicio del consumo de alcohol, el sexo etc. (191,192). Con relación a este último parámetro, encontramos alterada la concentración de los productos proteicos de SCNA, IL6R1 y MIF en hombres con consumo problemático de alcohol con una disminución superior al 50%. Por otro lado, se encontraron alteradas las tasas de transcripción de los genes TNFR1 y MIF con disminución en individuos con uso problemático del alcohol. Al medir la concentración del producto proteico se observó esa misma tendencia solo en la proteína MIF en la muestra general sin estratificar, no se evidencia cambios en la proteína TNFR1, mientras si se observa ese cambio en hombres si se estratifica la muestra por sexo. Con relación a SNCA, hay cambios en la expresión en hombres, pero opuestos, es decir hay un aumento en la síntesis de ARNm en los casos, mientras disminuye la concentración proteica. Aunque no hay que olvidar que los “sitios blancos” de medición eran distintos, el ARNm se midió en células mononucleares de sangre, mientras la proteína se midió en plasma. De igual forma, la diferencia de expresión en forma de ARNm y proteína de un mismo gen puede explicarse por fenómenos de regulación postranscripcional, traduccional y postraduccional. Podemos citar como microRNAs como miRNA-7, miRNA-153 y miRNA-433 alteran la expresión de la proteína SNCA en enfermedades neurodegenerativas en humanos y modelos animales haciéndola no coincidir con la expresión de ARNm(193,194). Con relación a MIF, en general se ha reportado su incremento en consumidores de alcohol, especialmente en bebedores fuertes, contrario a lo hallado en este estudio. Además, se ha evidenciado expresión diferencial en regiones cerebrales, epitelio, endotelio y linfocitos de sangre periférica. MIF es un regulador de citoquinas corriente arriba involucrado en muchas enfermedades de carácter inflamatorio e inmunitario. En este trabajo encontramos una correlación fuerte entre la expresión de ARNm de MIF y ARNm de TNFR1 como se evidencia en la tabla 3-5 y figura 3-4. De igual forma la expresión de sus productos proteicos están correlacionadas. Se sabe que MIF activa directamente la expresión TNF- α , IL2, IL8 e INF γ (195) y la inhibición de MIF reduce

sustancialmente la síntesis de estas cuatro interleuquinas (196). También existe una clara relación entre variantes del gen, la repetición -794 CATT₅₋₈ (rs5844572) y el SNV -173 G>C (rs755622) y las tasas de transcripción, siendo transcripcionalmente más activo las formas largas (7 y 8 repeticiones) que las cortas (≤ 5) y la variante C que G, polimorfismos que no fueron evaluados en este trabajo, aunque valdría la pena tener en un futuro esa información (115,197).

Con relación a TNF- α , el consumo agudo de etanol causa su supresión, mientras el consumo crónico causa su aumento, quizás por elevación de los niveles del factor de transcripción AP1 que se une a la región promotora del gen TNF- α , además de perderse la represión de las proteínas SMAD 3 y 4 que también interactúan con esta región promotora del gen(198). En este trabajo determinamos una disminución del 50 % de la expresión en forma de ARNm del receptor tipo 1 de TNF- α (TNFR1) en monocitos de individuos con uso problemático del alcohol. Teniendo en cuenta que la forma que determinamos de este receptor es la soluble y con su interacción con TNF- α ejerce una acción que disminuye aparentemente los niveles de TNF- α en sangre (lo secuestra). En consumidores habría 50% menos receptores solubles y al disminuir su presencia contribuiría aparentemente al aumento de la concentración de TNF- α , variable que no medimos en nuestro estudio. Por otro lado, la forma membranal del receptor podría verse involucrada en un proceso de desensibilización, disminución de su presencia en la membrana y por tanto su síntesis, que es un mecanismo de protección de las células a la prolongada acción del ligando TNF- α debido a su elevada concentración (154, 155). Se encontró diferencia en la tasa de transcripción para el gen TNFR1, disminuyendo casi en un 50 % en alcohol-dependientes, más esto no se ve reflejado en la concentración de proteínas que se mantienen iguales. Quizás podemos pensar en un evento de regulación postranscripcional que podría comprender disminución en la estabilidad del ARNm de TNFR1 en individuos con uso problemático del alcohol o eventos de

regulación epigenética como la presencia de microRNAs tipo miRNA-19a y miRNA-103a, que se han encontrado alterados en varias patologías adictivas y relacionados con la regulación de la expresión de genes como TNF- α , TNFR1, TNFR2, CFLIP, TRADD, CASP3 y CASP8(116). Sería interesante a futuro poder explorar los perfiles de microRNA's en pacientes con uso problemático de alcohol.

Los dos genes candidatos y que despertaron más interés fueron MIF y TNFR1 mostrando diferencias entre los controles y casos. Estos biomarcadores participan en procesos como: regulación de la diferenciación de macrófagos, activación de señal apoptótica, desdoblamiento de proteínas, respuesta celular a estímulos mecánicos, diferenciación de macrófagos, entre otros(124,137). Además de ser sintetizados por diversos tipos celulares, su efecto puede ser muy diferente. En este trabajo encontramos disminución en la expresión de estos dos marcadores a diferencia de otros autores. Tales discrepancias con otros estudios pueden estar relacionadas con el enfoque metodológico y tipo de muestras utilizadas para evaluar el estado funcional de monocitos (es decir, modelos animales frente a estudios humanos, análisis in vitro vs análisis ex vivo, el uso de blancos tisulares distintos, el uso o no de diferentes condiciones estimulantes), el estado de la ingesta de etanol en el momento del estudio (es decir, alcoholismo activo versus período de abstinencia), el estado nutricional de los pacientes, y la presencia o ausencia de enfermedad hepática alcohólica o algún tipo de daño hepático aun no conocidos o diagnosticados al momento de las entrevistas. También podríamos pensar que estos resultados se ajustan más al fenotipo de consumo agudo en los casos y no al de consumo crónico y elevado (129,138).

Por otro lado, encontramos diferencias significativas en la expresión de los genes a nivel proteico dependiendo del sexo de los participantes en el estudio, en los hombres con consumo problemático de alcohol tres genes SNCA, TNFR1 y MIF muestran aumento y disminución en su expresión relativa, respectivamente mientras en mujeres solamente MIF tiene este comportamiento. Es claro que

existen diferencias sexuales en la expresión de genes al igual que existen otro tipo de diferencias bioquímicas y/o fisiológicas entre hombres y mujeres. En los últimos años ha aumentado la evidencia de la existencia de dichas diferencias en diversas patologías que no se pueden explicar únicamente por diferencias hormonales. Definitivamente un factor de riesgo en el desarrollo del alcoholismo es el sexo, siendo los factores genéticos más importantes en caso de los hombres, mientras los factores ambientales en el caso de las mujeres. En nuestro estudio particular, estos genes están relacionados con respuesta inflamatoria e inmune que presentan patrones de expresión claramente diferenciados entre sexos (200–202).

4 Capítulo 4

4.1 Objetivo 3:

Determinar el estado de metilación de islas CpG de promotores de genes candidatos de respuesta inflamatoria relacionados con el uso problemático del alcohol comparando controles y casos.

4.2 Introducción:

Las técnicas de investigación epigenética están dirigidas al cambio epigenético más común que se conoce que es la metilación del ADN. Los métodos para el análisis de metilación pueden ser genes específicos (sensitivos o cuantitativos) o sobre todo el genoma. El estado de metilación de regiones promotoras de los genes seleccionados se estudió por la técnica de modificación con bisulfito del ADN seguido de PCR y electroforesis capilar. Una parte del ADN genómico aislado previamente se sometió a la modificación con bisulfito y luego se empleó una de dos modalidades para el subsiguiente procesamiento. Inicialmente está el método de bisulfito asociado a PCR y electroforesis capilar reportado previamente por Shi (203). Por otro lado, tenemos la prueba de metilación específica mediante PCR (MSP) seguida de secuenciación de Sanger(204). Empleamos las dos técnicas, la primera de uso general y la segunda como prueba de verificación de los resultados.

Se obtuvieron los perfiles de metilación de las islas CpG de segmentos de promotores de forma indirecta, del conjunto de genes seleccionados como producto de los resultados de los ensayos anteriores y se confirmó estos hallazgos mediante secuenciamiento directo de casos seleccionados.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACION

El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina no metiladas en uracilos mediante deaminación, la citosina metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina (204). Los primer's de PCR que se utilizaron flanquean las islas CpG que se modifican por igual después del tratamiento del ADN con el bisulfito y aprovecha las diferencias de metilación en su interior para discriminar entre estas secuencias. Entre uno y dos μg de ADN fueron desnaturalizados incubando a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min en un volumen de $250\text{ }\mu\text{l}$ con NaOH (concentración final $0,2\text{ M}$). Se agregó hidroquinona y bisulfito de sodio pH 5,0 preparados en fresco, a concentraciones finales de 10mM y $3,1\text{ M}$, respectivamente, seguido de una incubación a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h bajo una capa de aceite mineral. El ADN modificado se purifico y concentro usando tubos de filtración microcon 100 (Millipore, Bedford, MA) por 5 minutos en microcentrifuga a máxima velocidad, seguido de dos lavados con $300\text{ }\mu\text{l}$ de agua. El ADN se recuperó con $100\text{ }\mu\text{L}$ de TE 1x con inversión del tubo microcon. La desulfonación se llevó a cabo agregando $350\text{ }\mu\text{L}$ de NaOH con una concentración final de $0,3\text{ M}$ e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. El ADN se recuperó con microcon previo dos lavados con $350\text{ }\mu\text{L}$ de agua y resuspensión con $100\text{ }\mu\text{L}$ de TE 1X e inversión y centrifugación. Se realizó una etapa adicional de lavado y reconcentración adicionando $10\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de amonio 3M (1/10 de volumen) y $200\text{ }\mu\text{L}$ de etanol absoluto (2 volúmenes) y se incubo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Se centrifugo por 10 minutos a 12000 rpm , se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con $400\text{ }\mu\text{L}$ de etanol al 70%. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Se resuspendió el ADN con $50\text{ }\mu\text{L}$ de buffer TE 1X para la posterior PCR y

electroforesis capilar o con 50uL de agua grado biología molecular para PCR y su secuenciación.

Una parte de los ensayos de metilación del ADN se realizaron con el kit “Epimark™ bisulfite conversión kit”, siguiendo las indicaciones del fabricante. Preparando una mezcla de bisulfito que contenía metabisulfito de sodio sólido, agua libre de nucleasas y buffer de solubilización, se mezcla con 10 uL de ADN genómico (aproximadamente 2 ug). La reacción fue llevada a cabo en termociclador, la muestra se sometió inicialmente a desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, luego una incubación a 65 °C por 30 minutos, nuevamente desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido de una nueva incubación a 65 °C por 30 minutos y finalmente una última serie bajo las mismas condiciones. Se dejó a temperatura ambiente por 12 horas. Después, se llevaron a cabo una serie de pasos de desulfonación y limpieza de las muestras, con buffer de unión, buffer de lavado y buffer de desulfonación. Por último, el ADN fue resuspendido con buffer de elución, para su almacenamiento hasta su utilización en el siguiente ensayo que fue la amplificación del ADN modificado por PCR. Las secuencias de los primer’s y condiciones de PCR se obtuvieron empleando las bases de datos de NCBI y herramientas bioinformáticas de uso libre en la web como methPrimer y blast-NCBI (ver tabla 4-1). Las reacciones utilizaron aproximadamente 100 ng de ADN genómico modificado, 0,2 μM de cada primer, 200 μM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,75 U de Taq Polimerasa (Promega, USA) y 1,25 μl de DMSO como potenciador en un volumen final de 25 μl. Se usó como control negativo 100 ng de ADN genómico sin modificar. Como control positivo de metilación se utilizó productos de PCR metilados mediante metiltransferasa comercial, procedimiento que se detalla más adelante.

Tabla 4-1 Características de los primer’s empleados en la amplificación de segmentos del promotor ricos en secuencias CpG de los genes seleccionados en ADN modificado por la técnica del bisulfito.

Gen	Primer´s	Secuencia 5'--3'	Longitud del primer	Temperatura de hibridación	Longitud Amplicón (pb)
IFNG R1	Forward	TTTTTTTTATATTTAGAAGT TTAGGTTT	28	59,5	293
	Reverse	AACCCTACTCACACCCTA CATAAC	24		
SNCA	Forward	AAAATTTTGAAGATATTTG AATTAAG	27	59,9	444
	Reverse	CTAATCCTCCTCCTTCTCC TTCTC	25		
MIF	Forward	TAGTGAATGAATTGGGT TTTATTT	25	59,8	134
	Reverse	AATCTTTCTTAATCCTTTC ACTAAATCAC	29		
TNFR 1	Forward	GGGTTTAAGATTATTGGG ATTAGGT	25	60,0	216
	Reverse	CCAATAACAACAACAAT CAAACAC	25		
IL6R	Forward	GGTTATTGTTTATTGGTG GTTGATA	25	54,2	236
	Reverse	CAAAAAACATTTAAAAAA CTC	22		

Por otro lado, para la reacción de PCR de un lote de muestras de ADN modificado con bisulfito se empleó un kit especial para este tipo de modificación llamado bisulfito-Epimark® Hot Start Taq DNA Polymerase, con la siguiente composición por reacción: buffer Epimark 5X, 5 uL; dNTPs 10mM, 0,5 uL; primers F y R 10uM,

0,5 uL de cada uno; ADN modificado 6 uL; Epimark polimerasa (EpiMark® Hot Start Taq DNA Polymerase) 0,125 uL y 12,375 uL de agua GBM por muestra para un volumen final de 25 uL. Luego fueron aplicadas las siguientes condiciones de termociclado: 1) 1 ciclo de desnaturalización inicial (95°C, 30 segundos) 2) 35 ciclos. Desnaturalización (95°C, 15 segundos), hibridación (gen específico, 30 segundos) (Ver tabla 4-1) y extensión (68°C, 60 segundos) 3) 1 ciclo de extensión final (68°C, 5 minutos). Los amplificadores se conservaron a -20°C hasta ser utilizados en el siguiente ensayo.

La pureza e integridad del ADN se confirmó mediante la medición espectrofotométrica y electroforesis en geles de agarosa. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con SYBR®safe. Con el objetivo de verificar la eficiencia de la técnica, se secuenciaron algunas de las muestras metiladas y no metiladas mediante la técnica de Sanger.

4.3.2 Protocolo para metilación de productos de PCR purificados y empleados como ADN totalmente metilado de referencia.

Previo a iniciar el ensayo de electroforesis capilar y secuenciación de los segmentos amplificados previamente, se diluyó el reactivo S-adenosil metionina (SAM, solución madre de 32 mM) hasta 1600 µM tomando 1 uL y adicionándole 19 uL de agua libre de nucleasas. Se mezcló: 5 uL de buffer de reacción de metiltransferasa suministrado (10X) más 5 uL de SAM diluido (1600 uM), se le adiciono aproximadamente 1 µg ADN amplificado y purificado y un uL de la enzima metiltransferasa y se aforo con agua grado biología molecular hasta los 50 uL de volumen de reacción. Se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo al menos seis veces e incubo a 37 °C durante 1 hora. La reacción se detuvo calentando los tubos a 65 °C durante 20 minutos.

El estudio de los productos de PCR de las regiones promotoras seleccionados y su estado de metilación se realizó empleando dos aproximaciones experimentales como ya se mencionó arriba. Se seleccionaron algunas muestras, se purificaron y se les realizó secuenciamiento de Sanger. Por otro lado, los productos de PCR se amplificaron empleando un primer fluoro marcado con 5-FAM (5-caxboxifluoresceina), productos de este ensayo se corrieron en electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 310.

Electroforesis Capilar: Es una variante de las técnicas electroforéticas, que permite separar una gran variedad de compuestos y que al mismo tiempo incorpora un sistema de detección que facilita la cuantificación además de la separación en un mismo tiempo analítico. Al ser una técnica automatizada, eficaz y rápida, posibilita el procesamiento de gran cantidad de muestras en muy poco tiempo. La muestra es introducida por un sistema de inyección en el capilar. En su uso específico permite separar fragmentos de ADN marcados con diferentes fluorocromos en una sola corrida. La separación de los fragmentos de ADN de diferentes tamaños se realiza utilizando un polímero lineal de acrilamida (POP-4) contenido en el capilar. Al migrar a través del capilar los fragmentos se van separando, pasan por la ventana de detección dónde un láser emite señales que excitan los fluorocromos, dicha emisión es detectada por el equipo y transformada en registros gráficos o electroferogramas. La muestra, el amplificado (entre 0,5 y 2 uL) se disuelve en 12,5 uL de formamida Hi-Di y se le adiciona 0,5 uL de Rox-500 (Applied Biosystems), marcador interno de tamaño molecular fluoro marcado. Se desnaturaliza la muestra por 5 minutos a 95 °C e inmediatamente se coloca en hielo hasta el momento de montaje en el equipo de electroforesis capilar. Los fragmentos fueron corridos a 60 °C en el analizador genético ABI Prism 310 usando un capilar de 36 cm, polímero POP4, módulo de corrida GS STR POP4 (1.0 mL) F.md4, en promedio 30 minutos de corrido y los resultados de las corridas se analizaron con el software GenMarker v2.2.0.

Para el análisis estadístico se consideró una significación estadística con $p < 0,05$ y las pruebas estadísticas aplicadas fueron: análisis de distribución-Prueba de Shapiro-Wilk, comparación de varianzas-Prueba de Levene y Comparación de medias o medianas-test de U de Mann-Whitney.

4.4 RESULTADOS

A partir de ADN genómico modificado con bisulfito se amplificó regiones promotoras que contenían islas CpG de tres genes (SNCA, INFG1 y MIF) de los cinco seleccionados. El diseño de los primer's se realizó en zonas adyacentes libres de estas islas. El tratamiento con bisulfito convierte las citosinas sin metilar en uracilos y durante la amplificación estos son leídos como timinas, mientras las 5mC (5-metilcitosina) son leídas como citosinas. La acumulación de diferencias entre C/T en los amplificados produce una diferencia en la relación masa/carga. Nuestros ensayos y los reportados en la literatura (205) muestran que el ADN metilado migra más rápido que su contraparte no metilada. Las figuras 4-1 muestran los electroferogramas típicos de fragmentos de ADN modificado con bisulfito y amplificado empleando iniciadores de PCR específicamente diseñados para tal fin. Se observan los resultados para tres genes, en los electroferogramas se pueden observar dos picos, el de mayor tamaño corresponde a una muestra de ADN control sin metilar, es así como el segmento de SNCA generó un producto de tamaño en promedio de 450,6 bp; el INFG1 con un producto de 284,9 bp y MIF con un producto de 125,8 bp. El primer pico de menor tamaño en los electroferogramas corresponde al mismo segmento de ADN, pero metilado, con tamaños de 447,4; 284,8 y 124,7 pb, respectivamente. Algunos de los productos de la PCR de este ensayo fueron sometidos a secuenciamiento (tabla 4-2). En las figuras 4-3, que corresponden a electroferogramas de secuencia, se evidencia segmentos con metilación total y parcial, en este último caso dependiendo del porcentaje de islas CpG metiladas y su posición los

electroferogramas de secuencia pueden llegar a ser muy complejos de interpretar. Optando por la electroforesis capilar, diseño ya probado previamente(203), nos muestra los tamaños de los fragmentos amplificados, lo cual dependerá del grado de metilación, aunque si estas diferencias son pequeñas o hay cambio de posición de los grupos metilados no se podrán apreciar. Para poder tener un ADN metilado de referencia, experimentalmente se amplifico el segmento de interés y una parte se sometió a reacción de metilación total y se corrieron en electroforesis capilar y se determinaron los tamaños de estos productos. Por otro lado, se calculó el tamaño de estos amplificados metilados y sin metilar teniendo en cuenta el aparente cambio de masa por la reacción, de acuerdo con Boyd (205) en el contexto de análisis de metilación con bisulfito, la transición C/T resulta en aproximadamente 0,1 nucleótido (nt o bp) la diferencia en el cambio aparente de tamaño de los fragmentos y es aditiva. Los productos de PCR del ADN modificado con bisulfito que contienen C aparentemente más cortos migraran más rápido que los que contienen T, aunque podría presentarse alteraciones relacionadas con el tamaño de los amplificados (entre más grandes más difícil su resolución) y la presencia de estructuras secundarias también puede alterar la interpretación. En la tabla 4-3 se observa como la diferencia entre los segmentos metilados y no metilados experimentales y predichas no son iguales, siendo mucho mayores en las predichas, quizás una evidencia de la metilación parcial ocurrida en el experimento y detectada en la secuenciación o la ocurrencia de alguno de los eventos descritos aquí previamente(ver figura 4-3). Se observa claramente que la secuencia de segmentos de ADN de controles muestra mezcla de citosinas metiladas y sin metilar, lo que no se evidencia o es muy débil en los casos.

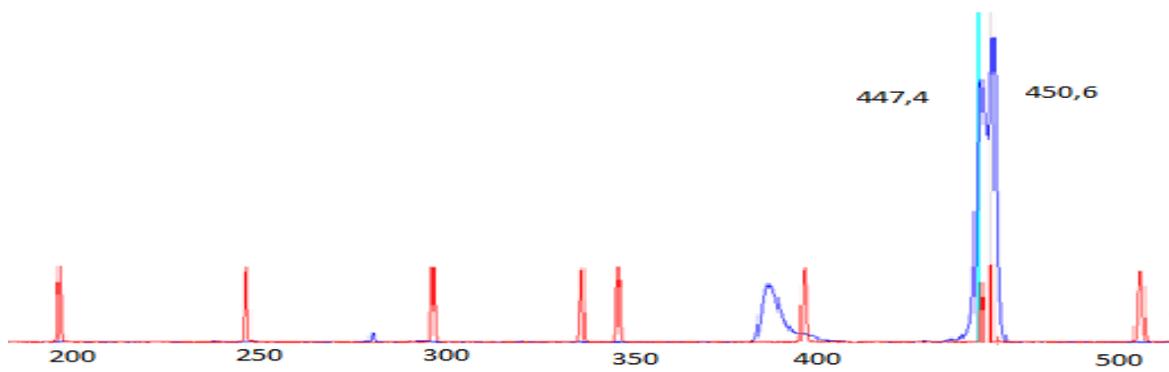
Al promediar los resultados para el grupo de controles y casos (uso problemático del alcohol) se encontró que no había diferencias en estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG del gen INFG1. Se encontró

diferencias estadísticamente significativas al analizar los segmentos del promotor rico en islas CpG de los genes SNCA y MIF, donde se evidencia más metilación en el grupo de casos de individuos con consumo problemático del alcohol. Con relación al gen MIF, la tasa de transcripción de ARNm y la producción de proteína es menor en alcohol-dependientes y el estado de metilación del promotor es mayor, lo cual se corresponde con lo esperado teóricamente, ya que la hipermetilación de la región promotora de los genes conlleva disminución de la tasa de transcripción (206) y al producirse menos ARNm se sintetizara menos proteína, lo que es concordante con nuestros resultados. Por otro lado, en el caso del gen SCNA, en general no hay cambios en la tasa de transcripción del ARNm, aunque si se toman solo los hombres hay un aumento en el grupo alcohol-dependientes. Con respecto a la proteína no hay diferencias en general, aunque en hombres hay descenso en la concentración y el estado de metilación del segmento seleccionado del promotor está más metilado en alcohol-dependientes, lo que se esperaría. No hay que olvidar que la concentración de proteínas se determinó en plasma sanguíneo y los análisis de ARNm y metilación del ADN se realizaron en células mononucleares de la sangre, dos blancos sanguíneos diferentes.

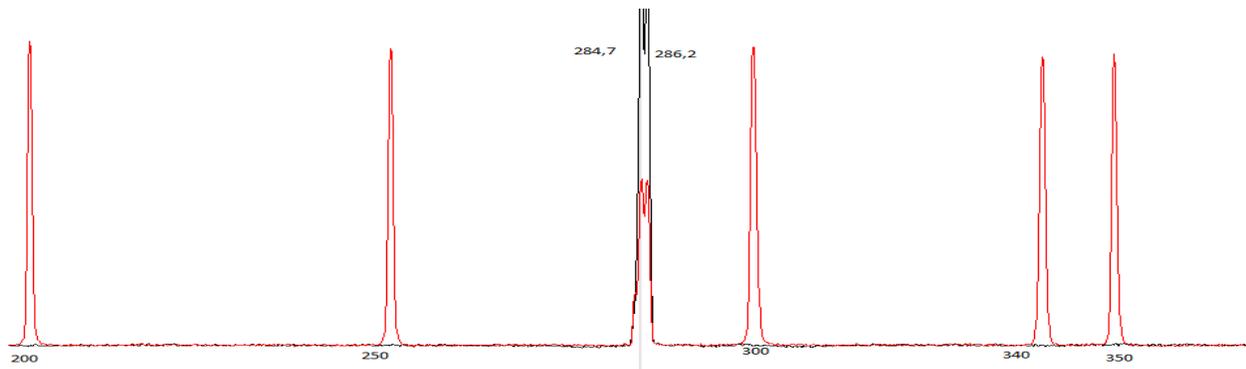
Tabla 4-2 Comparación de medias del tamaño de amplificadores de segmentos del promotor ricos en islas CpG de ADN modificado con bisulfito y corridos en electroforesis capilar de los genes SNCA, INFGR1 y MIF en controles y casos de individuos con consumo problemático de alcohol.

Gen	Distribución (Prueba Shapiro-Wilk)	Comparación de varianzas (Prueba Levene) Valor P	Comparación de medias o medianas (test de U de Mann-Whitney), nt o pb	Valor P
SNCA	Control: No Normal Alcohol: No Normal	0,040	450,6±0,44 447,4±0,46	0,000*
INFGR1	Control: No Normal Alcohol:	0,259	284,9±0,38 284,8±0,30	0,357

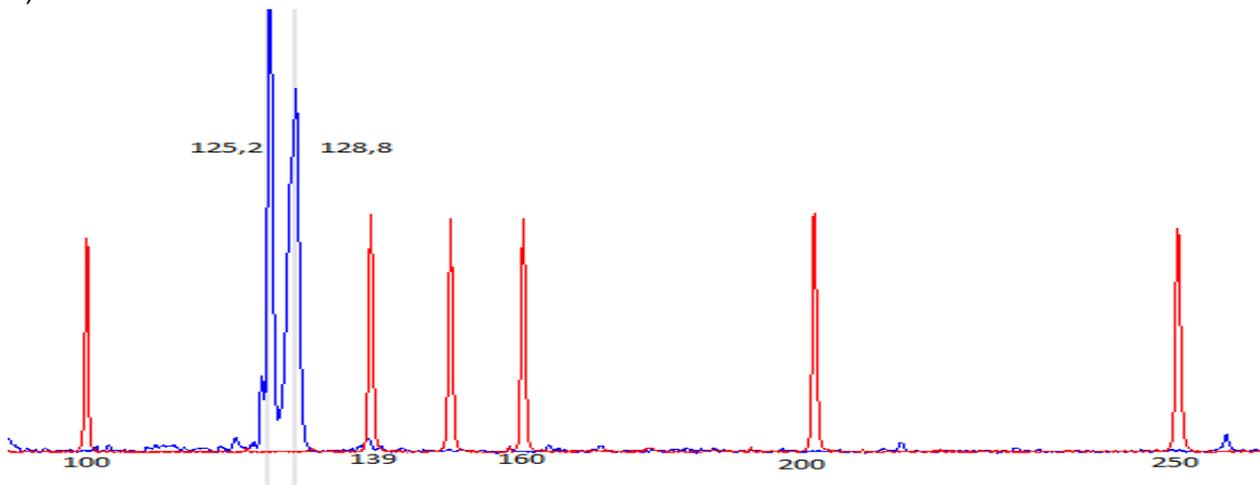
	No Normal			
MIF	Control:	0,000	125,8±0,08	0,009*
	No Normal Alcohol:		124,7±0,61	
	No Normal			



a)



b)



c)

Figura 4-1 Electroferogramas de amplificadores de genes seleccionados: SNCA (A), INFGR1 (B) y MIF (C) que muestra el estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG; el primer pico de cada figura corresponde a ADN control totalmente metilado mientras el segundo corresponde al mismo segmento sin metilar.

Tabla 4-3 Tamaños de grupo de segmentos génicos amplificados experimentalmente y predichos de ADN metilado y no metilado corridos en electroforesis capilar

Gen	Número de islas CpG	Tamaño del amplificado (nt, bp)	Tamaño promedio observado experimentalmente (nt, bp)			Tamaños predichos teóricamente (nt, bp)		
			ADN metilado	ADN sin metilar	Diferencia	ADN Metilado	ADN sin metilar	Diferencia
SNCA	23	444	447,4	450,6	3,2	441,7	446,3	4,6
INFGR1	25	293	284,8	284,8	0,1	290,5	295,5	5,0
MIF	9	134	124,7	125,8	1,1	131,1	132,9	1,8

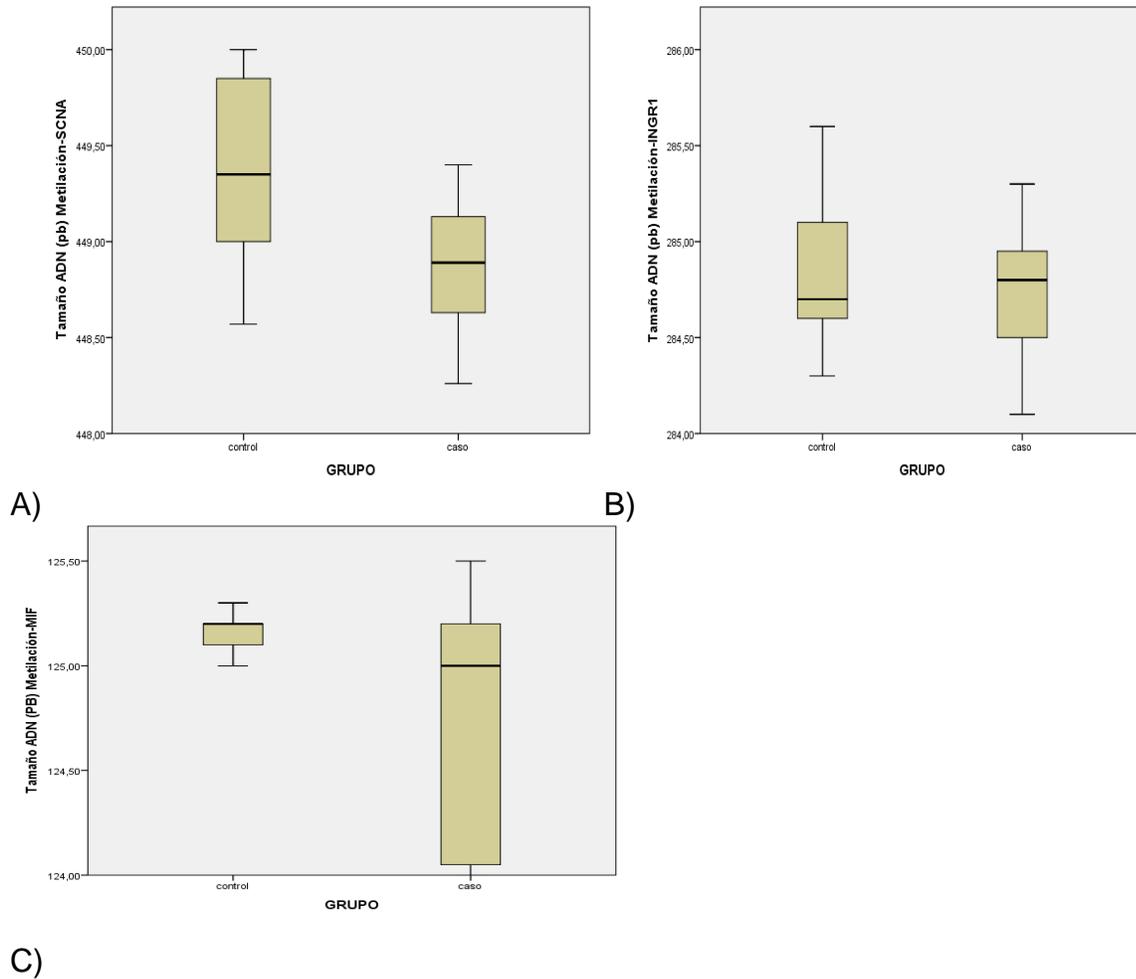
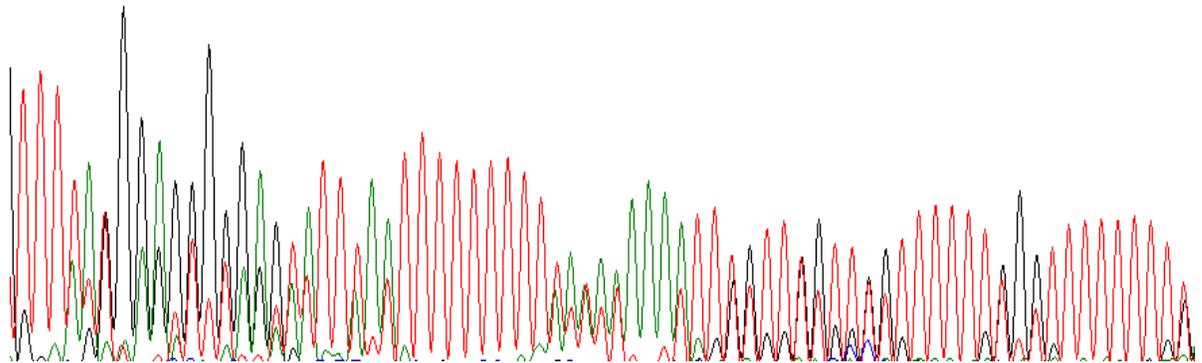


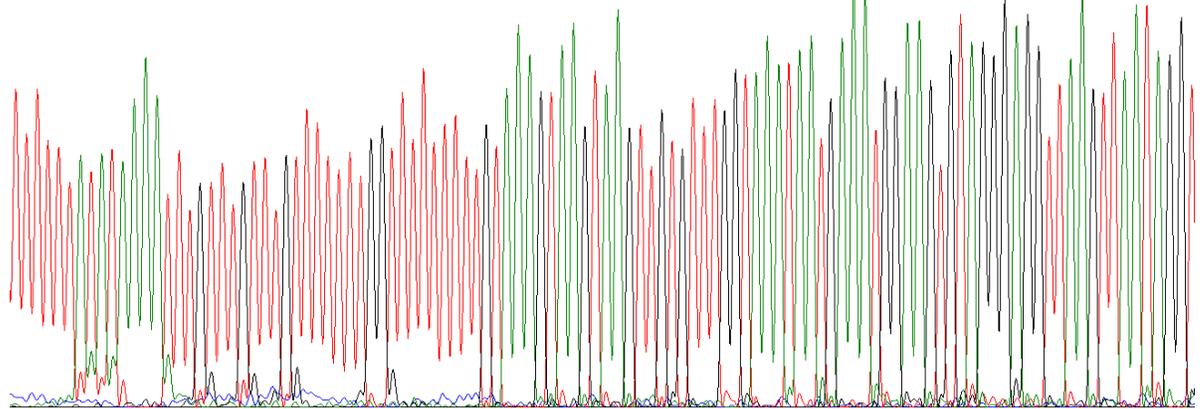
Figura 4-2 Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A), INFR1 (B) y MIF(C) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (consumo problemático de alcohol). Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.

100 110 120 130 140 150 160
· T T T T A K G G A G G G K G A G W W T T W A A T T T T T T T W W W W W A A A A T T K K T T K G T T K G T T T T T K G G T T T T T T T T T

89



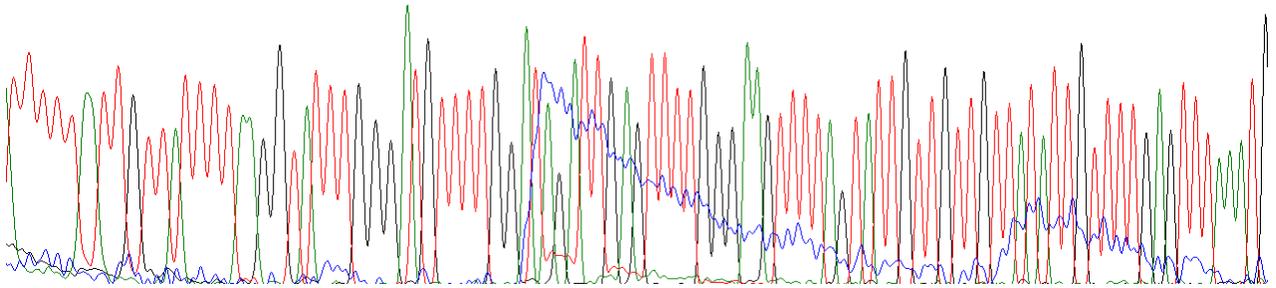
160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
T T T T T A T A A A A T T G T T T G T T T T T T T T T T T T G T A A A G T A A G T A A G T T G T G T T T G G T A A A T A A T G A A A T G G A A G T G A G G G A G G T A A G T T A A T A G G T



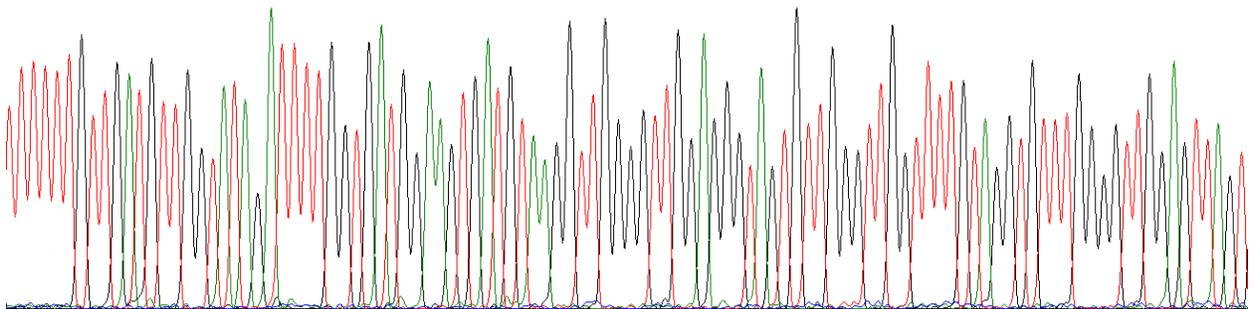
A)

13 VARIANTES GENÉTICAS, EXPRESIÓN GÉNICA, METILACIÓN Y BÚSQUEDA DE BLANCOS TERAPEUTICOS EN VÍAS DE RESPUESTA
6 INFLAMATORIA EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN UNIVERSITARIA COLOMBIANA CON PROBLEMAS DE CONSUMO DE ALCOHOL.

30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
T T T T T A T T G T T A T T T T A A G G T A T T T G G G A T G T T T T G G A T C C G A T T G A G T T T T G G G A A G T T T T A G T A T T G T T G T T G T T G T T A T A T T G T T T T G A G T T T A A A T G



10 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
T T T T T G T T G A T G T T G G T A T A G A T T T T G G T G A T G G A A G T G A T G T A A G G T T G G G G T T G G A G G G T A G T G T T G G G T T G T T T T G T A G G T G T T T G G G G T T G G A G T T A G T



B)

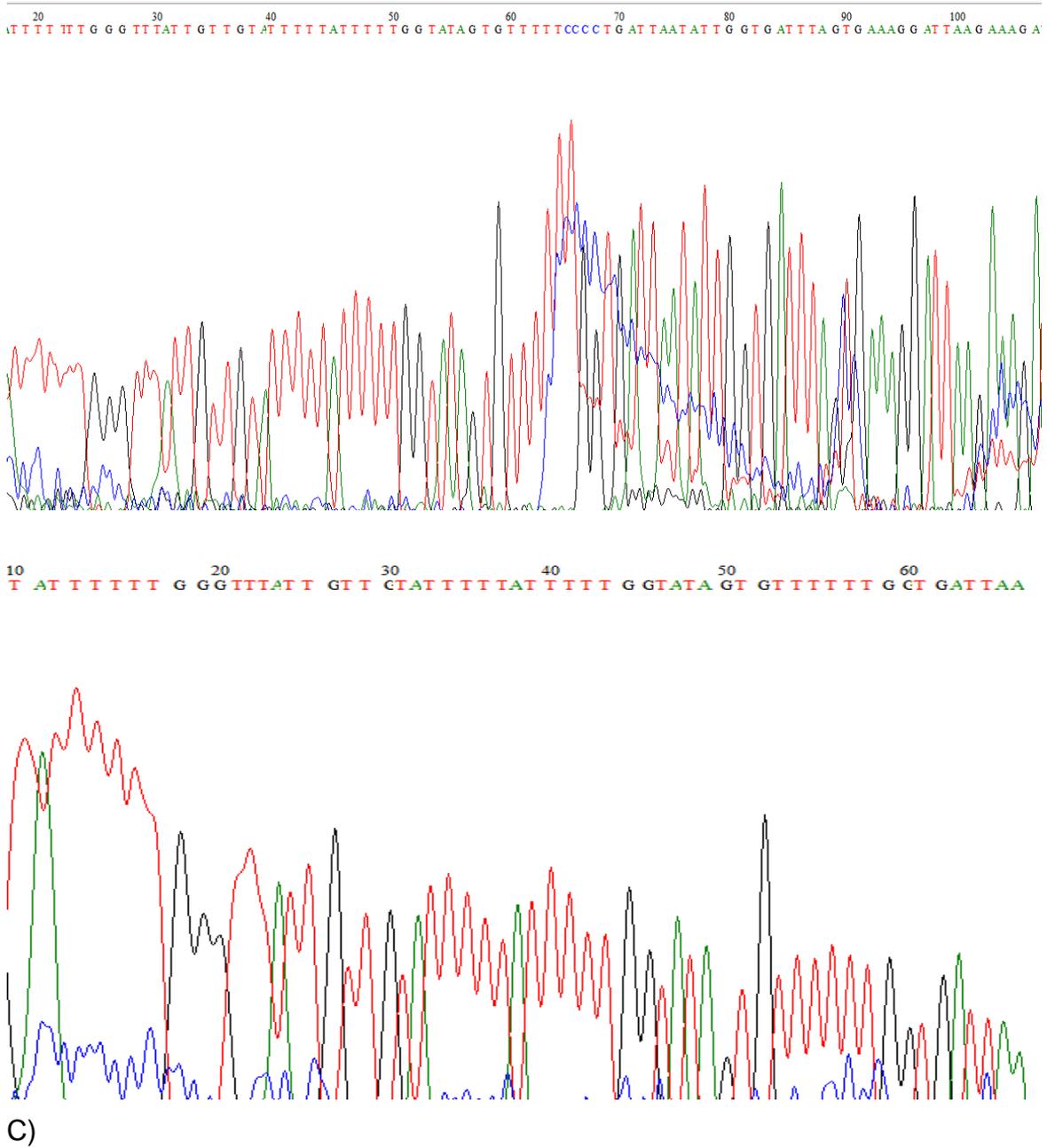


Figura 4-3 Electroferogramas de secuencia de amplificados de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A, B), INFR1 (C, D) y MIF (E, F) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles (primera imagen) y casos (segunda imagen, consumo problemático de alcohol). No olvidar: R=A o G; Y=C o T; K= T o G, W= A o T

4.5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Es claro que la identificación individual de SNV's de genes candidatos asociados como factores de susceptibilidad al alcoholismo representan un porcentaje muy bajo de la variabilidad genética, además de no ser reproducibles en todas las poblaciones y presentar una alta heterogeneidad. Por otro lado, por sí solos los factores ambientales no pueden explicar el incremento de la susceptibilidad al alcoholismo en una población. Al ser una patología de carácter multifactorial se ha propuesto que este tipo de adicción resulta claramente de la interacción entre la predisposición heredada, medio ambiente y los cambios neurobiológicos que tienen lugar en las personas como respuesta a un consumo crónico y elevado de alcohol. La epigenética puede cambiar dinámicamente en respuesta a factores externos y puede proveer un mecanismo que explique como el ambiente influencia la expresión génica y por tanto los diferentes fenotipos de la enfermedad a medida que progresa (tolerancia, abstinencia, recaída etc.) (34,51). Los procesos epigenéticos pueden ocurrir de manera global o loci específicos, es así como numerosos estudios recientes han evidenciado que la alteración en los patrones de metilación del ADN en la adicción al alcohol, por regla general, presenta hipometilación de las islas CpG en la mayoría de los casos en genes relacionados con el metabolismo del alcohol: ADH, ALDH y citocromo p450 entre otros. Aunque se ha evidenciado la hipermetilación de secuencias tipo CCGG y de islas CpG en promotores de genes candidatos que han sido asociados al alcoholismo como el transportador de dopamina (SLC6A3), vasopresina, péptido natriurético atrial, proopiomelanocortina, proteína del retículo endoplasmático inducida por homocisteína, alfa sinucleína etc. (59,207–209). En la mayoría de los casos la metilación tiene una función represora sobre la expresión de estos genes. Estos estudios han permitido establecer las redes funcionales que más frecuentemente han relacionado al alcoholismo con alteraciones del estado de

metilación de islas CpG de promotores de genes involucrados en neurodesarrollo, neurocomportamiento, metabolismo de lípidos y respuesta inflamatoria. Con relación a esta última función se ha encontrado al gen TLR4 hipermetilado que permite la alteración de la vía asociada a este receptor con efectos de neurotoxicidad y neurodegeneración. Por otro lado, otros autores han encontrado hipometilación en genes reguladores de la respuesta inmune a través de IL1 beta, IL-4, IL-10 y TNF- α que se relacionan con aumento de infecciones y cáncer en el tracto digestivo en los bebedores de alcohol. En particular, el consumo de alcohol a nivel hepático puede alterar la síntesis de proteínas relacionadas con respuesta inflamatoria e inmunidad innata y particularmente el metabolito S-adenosilmetionina y por tanto disminuir la metilación del ADN (210,211).

En esta área de investigación se encuentran numerosos trabajos con resultados contradictorios. La mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo en células de sangre, sin separar leucocitos de no leucocitos, sin conocer sus variaciones interindividuales. El nivel de metilación en el ADN de sangre periférica puede no reflejar lo que sucede en otros tejidos, específicamente en cerebro o células bucales, aunque algunos trabajos han mostrado su correspondencia (41,207,210,212). Faltan evidencias que relacionen las alteraciones en la metilación del ADN en los promotores y las tasas de transcripción y por ello la necesidad de realizar este tipo de ensayos. Por otro lado, se han encontrado diferencia en estados de metilación del ADN al comparar grupos étnicos, grupos etarios: a mayor edad, mayor grado de metilación; sexos: los hombres presentan mayor grado de metilación que las mujeres; la exposición a sustancias químicas (combustibles, metales pesados, arsénico, contaminantes orgánicos etc.), hábitos alimenticios, el fumar, realizar ejercicio físico, el índice de masa corporal, y particularmente en un mismo individuo los patrones de metilación son tejido-dependientes. Por tanto, al realizar estudios de metilación se debe tener en cuenta todos los aspectos anteriores que generan confusión, todos ellos alteran los patrones de metilación del ADN tanto de controles como de casos de

individuos con uso problemático del alcohol. De igual forma, se ha evidenciado que la alteración del patrón de metilación del ADN en los bebedores de alcohol va a depender de la fase de la enfermedad por la que estén transcurriendo: tolerancia, ansiedad, abstinencia y si tiene adicionalmente otras codependencias. Estos autores, también plantean la hipótesis de que las personas con alcoholismo exhiben una mayor aceleración de la metilación del ADN con el aumento en la edad en comparación con controles sanos en todos los tipos de tejidos (207,208,210,213,214).

Se ha evidenciado que polimorfismos en la región promotora de un gen y que diferencias del estado de metilación de las islas CpG de esta región (genes que las posean) están asociados con su expresión alterada. En este trabajo encontramos que el segmento estudiado del promotor de los genes SNCA y MIF con secuencias CpG se encontraba más metilado en individuos con uso problemático del alcohol que en los controles, hecho previamente evidenciado para SCNA por Bonsch et al en el 2005 (215) que indicarían disminución de la actividad transcripcional, lo que efectivamente se observa al analizar las tasas de transcripción de los genes y las concentraciones de proteínas séricas que son menores en los casos estudiados en nuestro trabajo. Lo anterior coincide con los reportes de la literatura donde han detectado el mismo patrón y en el caso de la SNCA se relacionaría con cambios en la neurotransmisión dopaminérgica y desregulación de la expresión de SNCA en enfermedades neurodegenerativas (216,217). Por otro lado, al estratificar por sexo se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres, siendo los casos de hombres los que presentan mayor grado de metilación para las regiones promotoras de los dos genes (ver figura 4-4). De igual forma, se encuentran diferencias en metilación si estratificamos por edad, en el rango de edad de 18 a 30 años el promotor de MIF y SNCA están más metilados en casos que en los controles, lo que coincide parcialmente con lo encontrado por otros autores, pues los casos están más metilados, pero en el grupo de jóvenes y no en el de mayor edad (217).

El promotor de MIF no contiene caja TATA, contiene numerosas islas CpG (34 para ser más exactos) desde la posición +1 hasta -300 a las que se une el factor de transcripción SP1, de igual forma posee secuencias tipo CRE, c-Myb, AP-4 y AML-1A a las que se les une diversos factores de transcripción, aunque solo SP1 y CREB lo hacen de manera conjunta regulando constitutivamente la expresión de MIF (136). De acuerdo con la literatura, la metilación de islas CpG proximales en MIF es un evento muy raro y no relacionado con su tasa de transcripción, siendo más probable que modificaciones de histonas como la acetilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y fosforilación intervengan en la remodelación de la cromatina y se constituyan en mecanismos epigenéticos fundamentales en la regulación de la expresión de MIF (218). Para el caso del gen SNCA desde la posición +1 hasta -1500 encontramos alrededor de 70 islas CpG, región promotora a la cual se unen diversos factores de transcripción. Se ha hallado un factor de transcripción que se unen allí y al intrón 1, una proteína con motivos de dedos de zinc (ZSCAN21) y existe otro factor GATA2 que se une a una región reguladora en el intrón 2 (219). Con relación a las islas CpG se han metilado con la técnica de CRISPR-cas9 y comprobado la disminución de su expresión en modelos *in vitro* de enfermedad de Parkinson (220).

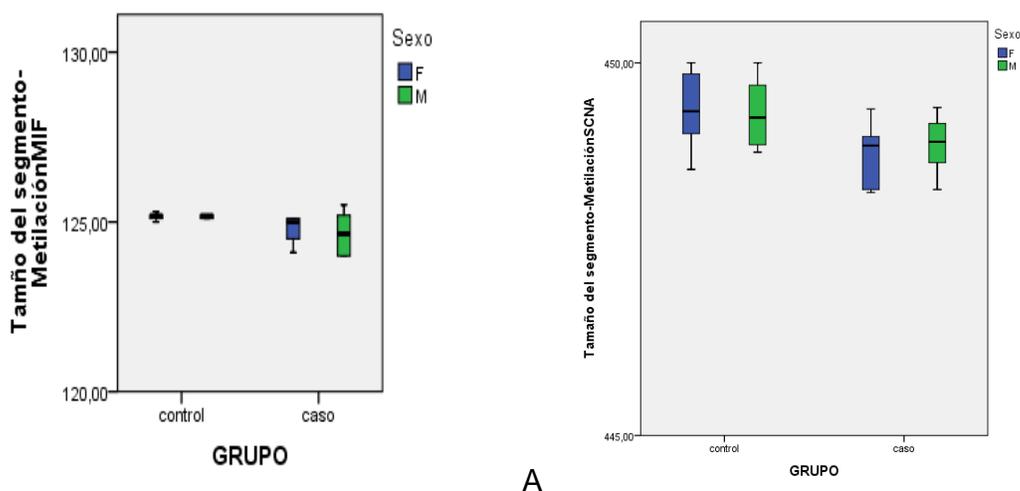


Figura 4-4 Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes MIF(A) y SNCA(B) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (consumo

problemático de alcohol) estratificados por sexo. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana

Para explicar esta hipermetilación en estos genes SNCA y MIF tendríamos que entrar en el terreno de la especulación. Una alteración en la maquinaria de la metilación, es decir en las metiltransferasas del ADN (DNMT) parece ser lo más probable a la luz de recientes estudios. Un ejemplo de ello es la alteración de la actividad de las DNMT, claves en el proceso de metilación del promotor de los genes reelina y BDNF en el hipocampo durante la inducción de la plasticidad sináptica. Fármacos como la zebularina y 5-aza-2-deoxicitidina, inhibidores de DNMT, pueden bloquear este proceso de inducción (217,221). Por otro lado, la evidencia para el proceso contrario es más contundente. Es ampliamente conocido como la avitaminosis y malnutrición que padecen los bebedores crónicos de alcohol y particularmente la deficiencia de folato y metionina necesarias para la síntesis de moléculas donantes de grupos metilo durante la metilación podrían explicar el fenómeno contrario como la hipometilación (210).

Los mecanismos epigenéticos son dinámicos y reversibles, agentes químicos que modifiquen la metilación del ADN y acetilación de las histonas en la cromatina podrían ser excelentes candidatos para intervenciones terapéuticas, incluso la identificación de patrones epigenéticos específicos asociados a patologías particulares podrían servir de biomarcadores para la detección, diagnóstico y/o intervenciones preventivas (34). La hipermetilación de los promotores de estos genes podría constituirse en candidatos a biomarcadores de la enfermedad.

En este trabajo hemos encontrado hipermetilación en segmentos del promotor de los genes SNCA y MIF y disminución en su expresión en individuos del grupo de casos de consumo problemático de alcohol para el gen MIF (tanto hombres como mujeres) y también disminución en la expresión de SNCA, pero solo en hombres

del grupo de casos. Por lo tanto, terapias epigenéticas que controlan la respuesta inflamatoria podrían estar implicadas en el manejo del alcoholismo, además que podrían constituirse en biomarcadores de diagnóstico y ser determinados fácilmente mediante una “biopsia líquida” no invasiva. Teniendo en cuenta la importancia de caracterizar estas proteínas como posibles blancos terapéuticos, es fundamental realizar análisis informáticos para valorar su papel como potenciales blancos terapéuticos.

5 Capítulo 5

5.1 Objetivo 4:

Integrando los datos génicos, transcripcionales, de estado de metilación, identificar y caracterizar biomarcadores, posibles dianas terapéuticas del alcoholismo.

5.2 Introducción:

El proceso de desarrollo de un fármaco históricamente ha sido poco eficiente, de alto costo y se han basado en ensayos de prueba/error de compuestos químicos sobre cultivos celulares y/o animales. El paradigma cambió y actualmente el desarrollo de fármacos implica la identificación de un blanco terapéutico, un acercamiento bioinformático en cada una de las etapas de desarrollo con un gran arsenal de herramientas computacionales (222).

Cualquier acercamiento para entender el funcionamiento de una proteína debe partir del estudio de su estructura y ésta depende de la secuencia de residuos de aminoácidos que la conforman. De la estructura tridimensional depende la presencia de grupos químicos que determinaran la actividad biológica de la proteína y su posible interacción con otras moléculas, lo que se puede estudiar mediante diferentes acercamientos informáticos. Una de esas estrategias podría ser el diseño de fármacos basado en su estructura tridimensional, análisis de la función y de sus interacciones. Por otro lado, de los resultados obtenidos en la

determinación de estructuras tridimensionales de proteínas que ha establecido que la estructura de las proteínas es estable, los plegamientos de todas las proteínas depositadas en base de datos con estructura 3D está en el rango de 1.000 a 10.000, lo que hace que se puedan descargar modelos con buenas características o generar los modelos por homología como una buena alternativa para crear estructuras tridimensionales que nos aproximen a la forma de la proteína y por otro lado, el docking molecular nos permite realizar simulaciones de las posibles interacciones de estos modelos con posibles ligandos de interés terapéutico (223,224).

De nuestros resultados del análisis de variantes genéticas, de expresión génica (ARNm y proteínas) y del estado de metilación de promotores, seleccionamos dos proteínas de interés, MIF (Factor inhibidor de la migración de macrófagos) y SNCA (alfa sinucleína) como posibles blancos farmacológicos.

5.3 Metodología:

5.3.1 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO

La interacción entre el blanco terapéutico (proteína) y el fármaco o candidato a fármaco (ligando) se realizó mediante docking molecular. La estructura de las proteínas se buscaron en PDB (protein data bank, <https://www.rcsb.org/>) o se modelaron en swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) y la estructura de los ligandos se descargaron de drug bank (<https://go.drugbank.com/>) y/o pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para MIF, limitando la búsqueda a estructuras completas obtenidas por difracción de rayos X y de la especie humana se obtuvieron 25, de las cuales solo dos presentaban buena resolución, valores R buenos, no eran mutantes y no estaban acomplejadas con otro compuesto. Mientras tanto, para SNCA, de igual manera, limitando la búsqueda en especie humana, secuencia completa, modelos obtenidos con rayos X de buena resolución se obtuvieron 11 estructuras, aunque la mayoría estaban unidas

a un ligando y con valores R no muy buenos. Los modelos encontrados para SNCA eran mutantes, formaban aglomerados, no eran de excelente calidad, por lo que este estudio se realizó de manera mixta, es decir usando modelos descargados de las bases de datos y mediante modelado por homología, y luego se realizó el Docking molecular haciendo la aproximación a la interacción de un blanco terapéutico y diversos ligandos.

Se buscó las secuencias de estas proteínas en la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), que es uno de los repositorios de secuencias de proteínas más empleados en el mundo. Se descargó de allí las secuencias proteicas en formato FASTA. Por otro lado, se empleó la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en donde se alineó las secuencias de las proteínas blanco-descargadas, en el paso anterior, contra las depositadas en la base de datos de PDB y se determinó si tenían estructura cristalográfica resuelta y se evaluó su calidad. Para un caso, luego se procedió a construir modelos por homología, las secuencias de las proteínas de interés se analizaron en el programa “modeller” de swissmodel en donde obtuvimos los templates, seleccionando algunos de ellos para generar nuestros modelos. Tanto para MIF como para SNCA se seleccionaron los modelos y descargaron en formato PDB y se validaron en pdbsum, verify3D, ProSa-web, Quick2D. Los modelos fueron presentados en la plataforma DoGSiteScorer (<https://proteins.plus/>) (225), para predecir cavidades en sus estructuras 3D. Las estructuras tridimensionales se observaron con el programa pymol (<https://pymol.org/2/>) y su interacción con los ligandos seleccionados se construyó con herramientas como PATCHDOCK (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) y/o DOCKTHOR (<https://www.dockthor.incc.br/v2/>). Los ligandos fueron seleccionados de la base de datos de Drugbank y/o Pubchem y sus estructuras 3D fueron descargadas de allí en formato pdb u otro compatible (223,226). Finalmente, la identificación de las interacciones no covalentes entre las proteínas y los ligandos con el sitio seleccionado, teniendo en cuenta la presencia de

moléculas de agua, estado de protonación de los residuos de aminoácidos y el delta G de unión. Esta determinación se realizó con el programa Protein-Ligand Interaction Profiler (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

5.4 Resultados:

5.4.1 En UNIPROT se buscó las secuencias de las proteínas de interés:

Se buscó la secuencia de la proteína de interés (MIF) en la base de datos de uniprot (The Universal Protein Resource, Consortium), la seleccionamos y descargamos su secuencia en formato FASTA.

```
>sp|P14174|MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIF PE=1 SV=4
```

```
MPMFIVNTNVPRASVPDGFSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSS  
EPCALCSLHSIGKIGGAQNRSYSKLLCGLLAERLRISPDRVYINYYDMNAANVGW  
NNSTFA
```

De igual forma se procedió con la proteína SNCA

```
>sp|P37840|SYUA_HUMAN Alpha-synuclein OS=Homo sapiens OX=9606  
GN=SNCA PE=1 SV=1
```

```
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVA  
TVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGA  
PQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
```

En BLAST, alineamos las secuencias de interés contra la base de datos de PDB: Se realizó la alineación entre las secuencias de residuos de aminoácidos de las proteínas objetivos y los residuos de aminoácidos de las proteínas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) a través del servidor BLAST (155) basándose en la identidad entre secuencias de aminoácidos. Para MIF se

encontraron dos secuencias depositadas en el banco con 100 % de identidad, mientras para SNCA solamente una (figuras 5-1 y 5-2).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor [Homo sapiens]	241	241	100%	9e-85	100.00%	3HOF_A
Chain A_Human Glycosylation-Inhibiting Factor [Homo sapiens]	241	241	100%	1e-84	100.00%	1GIF_A
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor (Mif) [Homo sapiens]	239	239	100%	6e-84	99.13%	1MIF_A
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor (Mif) Complexed With Inhibitor [Homo sapiens]	239	239	99%	6e-84	100.00%	1GCF_A
Chain A_PROTEIN (MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR) [Homo sapiens]	239	239	99%	8e-84	100.00%	1CAT_A
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor [Homo sapiens]	238	238	99%	2e-83	99.12%	5BSJ_A
Chain A_Macrophage migration inhibitory factor [Homo sapiens]	238	238	99%	2e-83	99.12%	6BGG_A
Chain A_Macrophage migration inhibitory factor [Homo sapiens]	238	238	99%	3e-83	99.12%	6OYE_A
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor [Homo sapiens]	237	237	99%	3e-83	99.12%	4EUL_A
Chain A_Macrophage migration inhibitory factor [Homo sapiens]	237	237	99%	4e-83	99.12%	6BGT_A
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor [Homo sapiens]	237	237	99%	5e-83	99.12%	
Chain A_Macrophage Migration Inhibitory Factor [Homo sapiens]	236	236	99%	6e-83	99.12%	

Figura 5-1 Resultado del alineamiento de la secuencia de interés MIF con las secuencias depositadas en PDB

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Chain A_Alpha-synuclein [Homo sapiens]	Homo sapiens	207	207	100%	5e-70	100.00%	140	1XQ8_A
Structure of recombinantly assembled E46K alpha-synuclein fibrils [Homo sapiens]	Homo sapiens	206	206	100%	2e-69	99.29%	140	6UFR_A
Cryo-EM structure of A53T alpha-synuclein amyloid fibril [Homo sapiens]	Homo sapiens	206	206	100%	2e-69	99.29%	140	6LRQ_A
Chain A_Alpha-synuclein [Homo sapiens]	Homo sapiens	205	205	100%	6e-69	99.29%	140	7E0F_A
Cryo-EM structure of phosphorylated Tyr39 alpha-synuclein amyloid fibril [Homo sapiens]	Homo sapiens	204	204	100%	9e-69	99.29%	140	6L1T_A
Cryo-EM structure of alpha-synuclein H50Q Narrow Fibril [Homo sapiens]	Homo sapiens	204	204	100%	9e-69	99.29%	140	6PEO_A
Structure of alpha-synuclein fibrils [Homo sapiens]	Homo sapiens	168	168	86%	9e-55	100.00%	121	6FLT_A
Chain A_Alpha-synuclein [Homo sapiens]	Homo sapiens	161	161	71%	3e-52	100.00%	100	7LC9_A
cryo-em structure of alpha-synuclein fiber [Homo sapiens]	Homo sapiens	85.1	85.1	45%	2e-22	100.00%	63	6A6B_A
Chain A_Alpha-synuclein [Homo sapiens]	Homo sapiens	68.2	68.2	39%	6e-16	98.18%	55	6L4S_A
Crystal structure of human alpha-synuclein (32-57) fused to maltose binding protein (MBP) [Escherichia coli]	Escherichia coli	53.9	53.9	21%	7e-09	86.67%	397	3Q2T_A
Structure of alpha-synuclein in complex with an engineered binding protein [Homo sapiens]	Homo sapiens	44.3	44.3	15%	6e-07	100.00%	22	4BXL_C
Crystal structure of human alpha-synuclein (10-42) fused to maltose binding protein (MBP) [Escherichia coli]	Escherichia coli	39.3	39.3	13%	8e-04	100.00%	404	3Q26_A

Figura 5-2 Resultado del alineamiento de la secuencia de interés SNCA con las secuencias depositadas en PDB

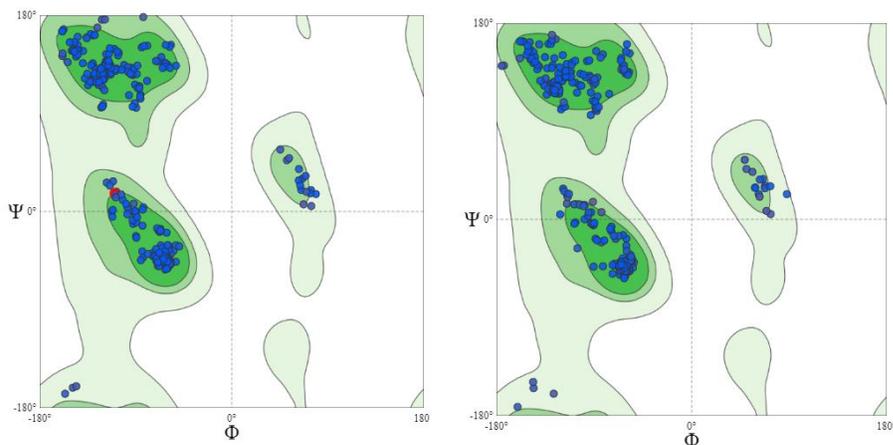
5.4.2 Generación de modelos

Como se mencionó previamente, en PDB buscamos las estructuras 3D reportadas utilizando los siguientes criterios: organismo de origen, estructura nativa o mutante, método empleado en su resolución, grado de resolución, presencia o no de ligando. Encontramos estructuras, la mayoría unidas a ligandos, algunas formando agregados, con valores de criterios de validación muy variados desde buenos pasando por regulares y malos hasta finalmente muy malos.

Tanto para MIF como para SNCA se encontraron modelos en la base de datos, con muy variados parámetros de calidad, se decidió crear modelos en Swiis model, buscamos los templates para generar nuestros modelos con el programa MODELLER (227). Para MIF se encontraron 13 templates, todos obtenidos por difracción de rayos X, de los cuales seis tenían un 100% de identidad y nueve de ellos sin ligandos. Se seleccionaron dos templates (códigos PDB:1gif.1.A y 3dji.2.A) con valores de GMQE cercanos a uno y con ellas se construyeron dos modelos a los que llamaremos en adelante modelo 1 y modelo 2, respectivamente. Por otro lado, para SNCA se encontró 9 templates, todos con identidad del 100 %, además de corresponder a la especie de referencia, siete de ellos, se obtuvieron por resonancia magnética nuclear (RMN), uno por microscopía electrónica (EM) y uno por difracción de rayos X aunque con ligando y solo un dominio. Se seleccionaron dos templates, el primero de RMN (código PDB 2n0a.1.J) y el segundo template, también RMN (código PDB 2n0a.1.b), con valores de GMQE más altos, aunque bajos comparados con los datos para MIF y con ellos se construyeron dos modelos que llamaremos modelo 1 y modelo 2, respectivamente.

5.4.3 Validación de los modelos bio-informáticamente

Se obtuvieron los gráficos de Ramachandran para los dos modelos de cada proteína (228). Para la validación de los modelos obtenidos, se utilizó los gráficos de Ramachandran generados por structure assessment de Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/assess>), que nos permite visualizar la distribución de los ángulos diédricos psi y phi que contribuyen a la formación de la estructura de la proteína. Los gráficos mostraron la mayoría de los residuos de aminoácidos en regiones favorables de MIF con valores de 98% y 96% para cada modelo 1 y 2 respectivamente. Mientras el porcentaje de residuos en regiones desfavorables estuvo aproximadamente en 0,30% para ambos modelos. De acuerdo con los estándares, un modelo es de excelente calidad cuando tiene más del 90% de residuos de aminoácidos en la región más favorable (ver figura 5-3 a y b y tabla 5-1), requisito que cumplen nuestros dos modelos para MIF. Por otro lado, para los modelos de SNCA se observaron que un 91 y 88,41 % de los residuos de aminoácidos en regiones favorables, este último menor del 90 % para considerarlos de excelente calidad y con valores mayores de residuos en regiones desfavorables. Teniendo en cuenta este criterio, los dos modelos de SCNA son de menor calidad, si los comparamos con los modelos de la proteína MIF (ver figura 5-3 y tabla 5-1).



A

B

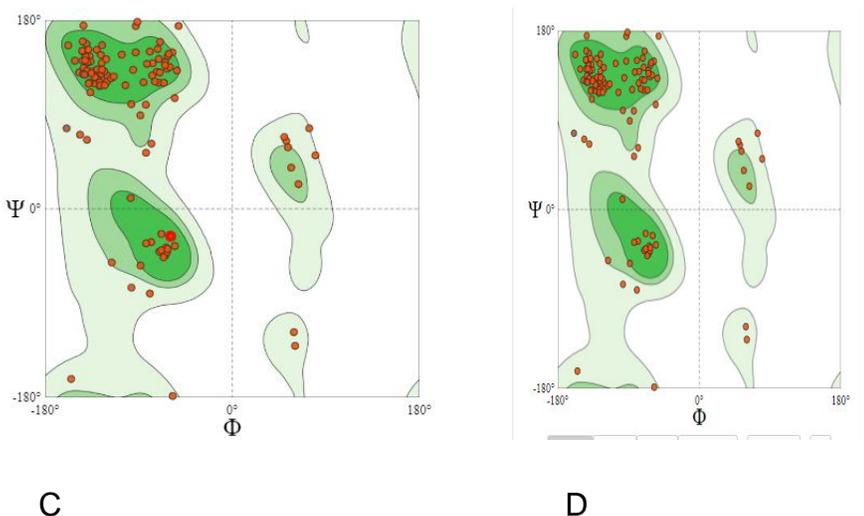


Figura 5-3 Resultados de los gráficos de Ramachandran para MIF, el Modelo 1 (A) y el Modelo 2(B) y para SNCA, el modelo 1(C) y el modelo 2(D)

Tabla 5-1 Resultado de los parametros de los gráficos de Ramachandran para los modelos obtenidos (1 y 2) de la proteína MIF y (1 y 2) de la proteína SNCA

Característica Modelo	% residuos de regiones favorables	de en	valores atípicos (%) de residuos en regiones permitidas	valores atípicos (%) de residuos en regiones desfavorables
MIF-Modelo 1	98.23		6,32	0,29
MIF-Modelo 2	96.73		1.77	0.30
SNCA-Modelo 1	91.30		1.45	0.97
SNCA-Modelo 2	88.41		4.35	2.91

También se calcularon las puntuaciones zeta en el servidor Web ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) de las estructuras de los modelos obtenidos: para MIF, el modelo 1 obtuvo un valor z de -6,46, mientras que para el modelo 2 fue de -6,15, valores cercanos con el valor obtenido para la proteína molde (1MIF) que fue de -6,2. Por otro lado, para SNCA, los dos

modelos obtuvieron un puntaje de 1,37 más alejados del valor obtenido para la proteína molde de referencia que fue de 1,8. Para MIF las puntuaciones están en el rango característico de la proteína nativa, es decir las estructuras de los modelos no contiene errores, aunque para SNCA este indicador no es el mejor (Ver figura 5-4).

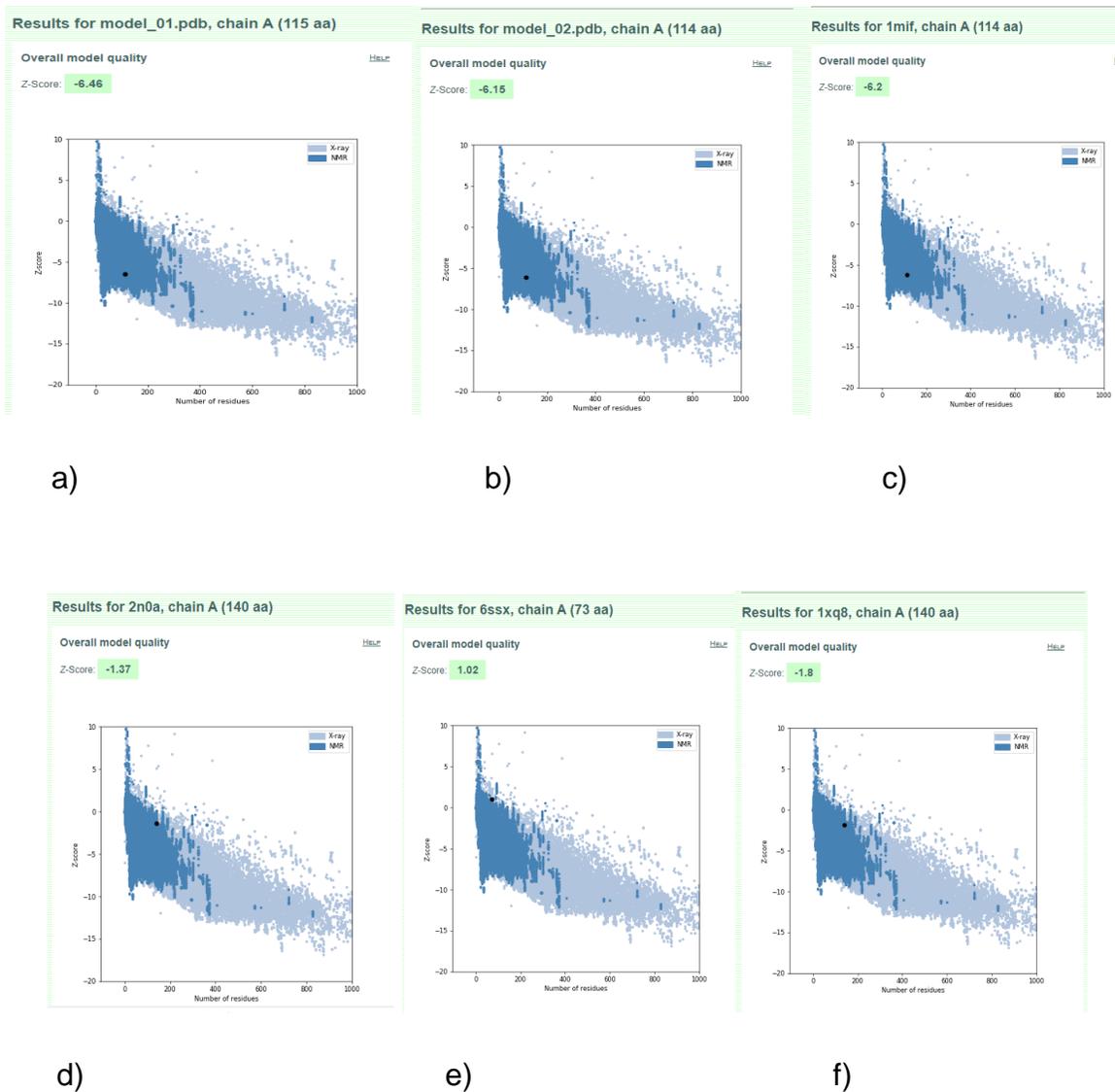
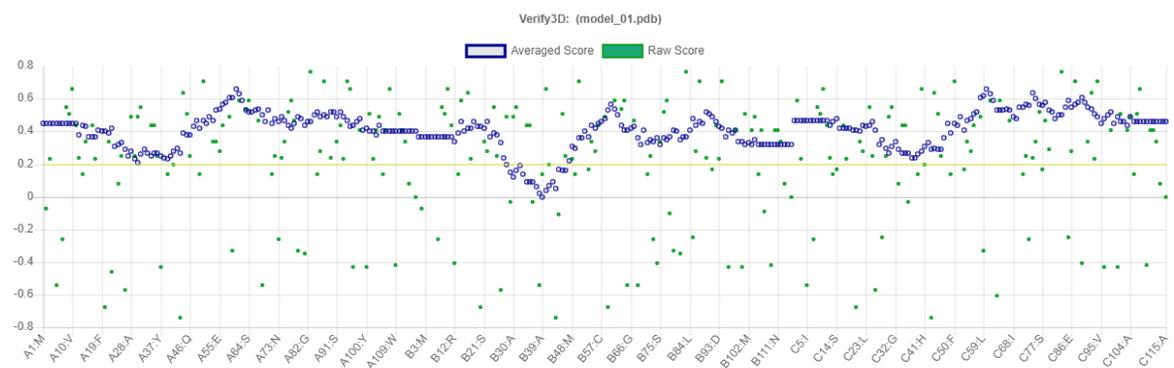
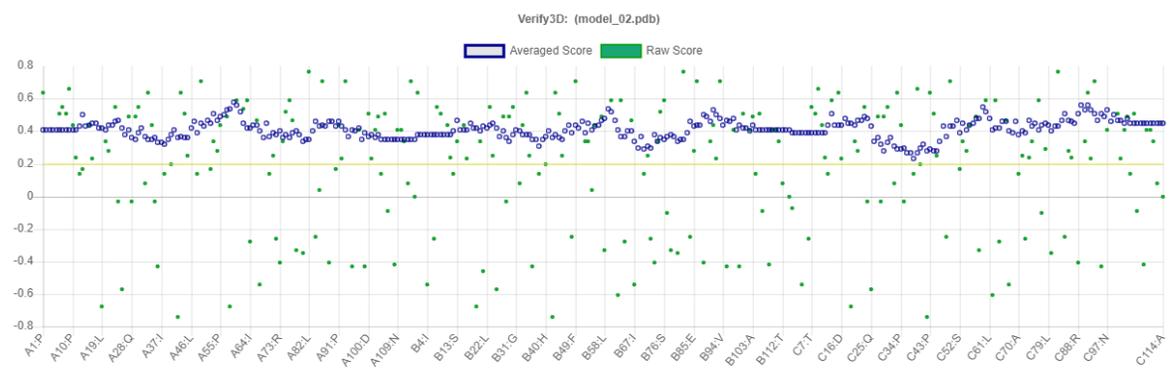


Figura 5-4 Resultados de los Valores Z calculados con Web ProSa para los modelos 1, 2, referencia de MIF (a, b y c) y para los modelos 1, 2 y referencia de SNCA (d, e y f)

Con la herramienta Verify3D se analizó la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D). (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/?job=153538>). Para el modelo 1 de la proteína MIF, el 94,78% de los residuos de aminoácidos arrojaban una puntuación 3D-1D promedio igual o superior a 0.2, valor con el cual se considera que pasa el análisis. De igual forma, el programa informa que por lo menos 80% de los residuos de aminoácidos alcanzaban una puntuación ≥ 0.2 en el perfil 3D/1D (ver figura 5-5-a).

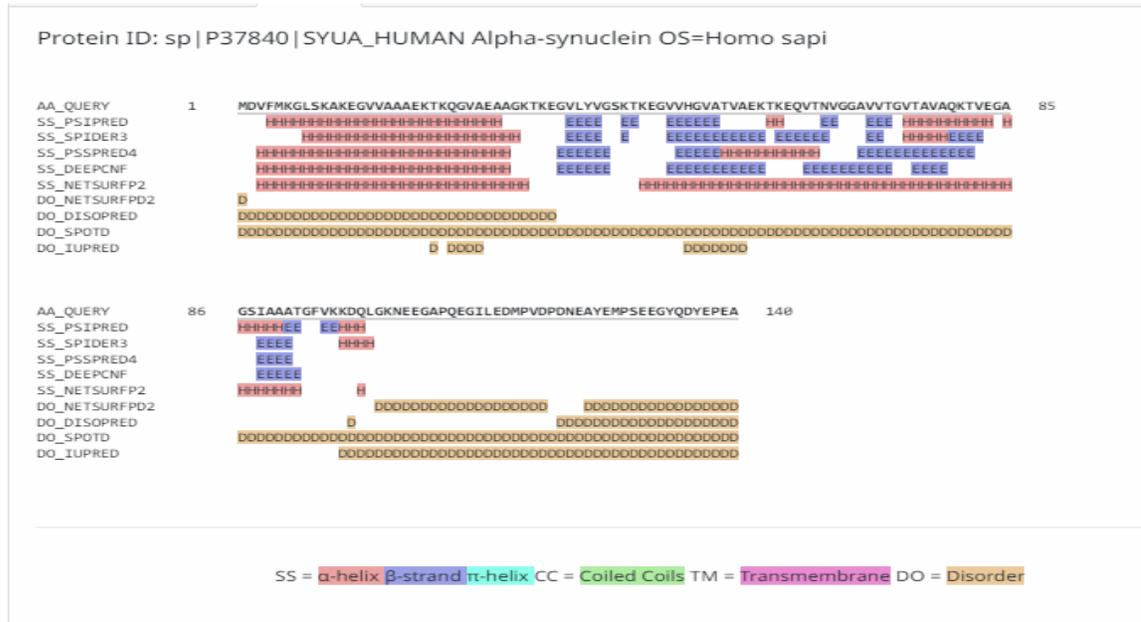


a)



b)

Figura 5-5 Compatibilidad modelo 3D-1D para el modelo 1 (a) y modelo 2 (b) de MIF.



b)

Figura 5-6 Estructuras secundarias para la secuencia de las proteínas seleccionadas MIF (a) y SNCA(b)

Al comparar los dos modelos tridimensionales de MIF, se observa una gran similitud visual (figura 5-7) presentando estructuras de hélice y hojas plegadas similares. Se compararon los modelos obtenidos mediante el programa de Swiss prot y muestra valores del indicador LDDT (Local Distance Difference Test) de uno o cercanos en la mayoría de los residuos, con un valor global de 0,9382. Mientras que los modelos para SNCA muestran un valor global LDDT de 0,3278 para el modelo 1y de 0,3383 para el modelo 2, lo que nos indica la mala calidad de los modelos para esta proteína.

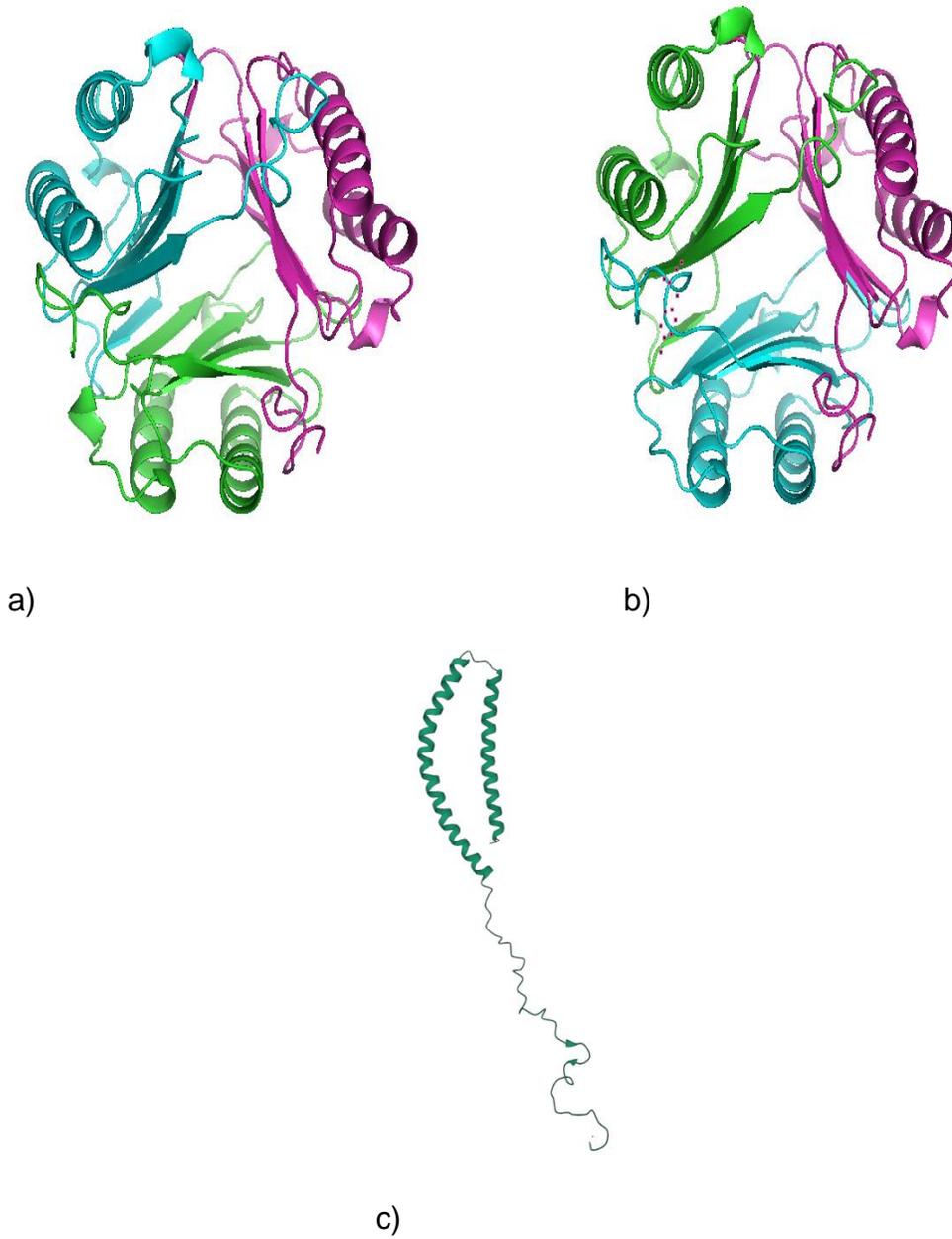


Figura 5-7 Modelo 1 (a), modelo 2(b) de MIF obtenidos por el servidor swiis model y modelo de SCNA descargada de PDB y visualizadas con Pymol.

Para MIF, los modelos 1 y 2 obtenidos en swiis model se descargaron en formato PDB, visualizaron y analizaron con PYMOL(232) visor molecular de código abierto (ver figura 5-7). Además, se realizó la predicción de cavidades, los dos modelos de MIF y uno de SNCA seleccionados, los cuales fueron presentados en la plataforma DoGSiteScorer (<https://poseview.zbh.uni-hamburg.de/> de proteinsplus) (225), en la que se predijeron cavidades en la estructura 3D (ver figura 5-8) y obtuvieron parámetros de interés farmacológico. En las tablas 5-2 y 5-3 se presentan los parámetros más relevantes para las cavidades detectadas con un gran potencial para la unión de diversos ligandos. Se hallaron los posibles sitios de unión o cavidades que permitan la unión o interacción con algún ligando, siendo muy similares en los dos modelos de MIF, igualmente se halló ese bolsillo en el modelo de SNCA. Seguidamente se determinó los parámetros de volumen, área y profundidad de estos posibles sitios de unión de ligandos. El programa proporciona una puntuación de farmacibilidad para cada cavidad combinando tres parámetros que describen el volumen, la hidrofobicidad y el recinto (contorno). De esta forma se estableció una cavidad en cada modelo con gran interés para la unión de ligandos ya que obtuvo puntajes elevados y muy superiores a las demás.

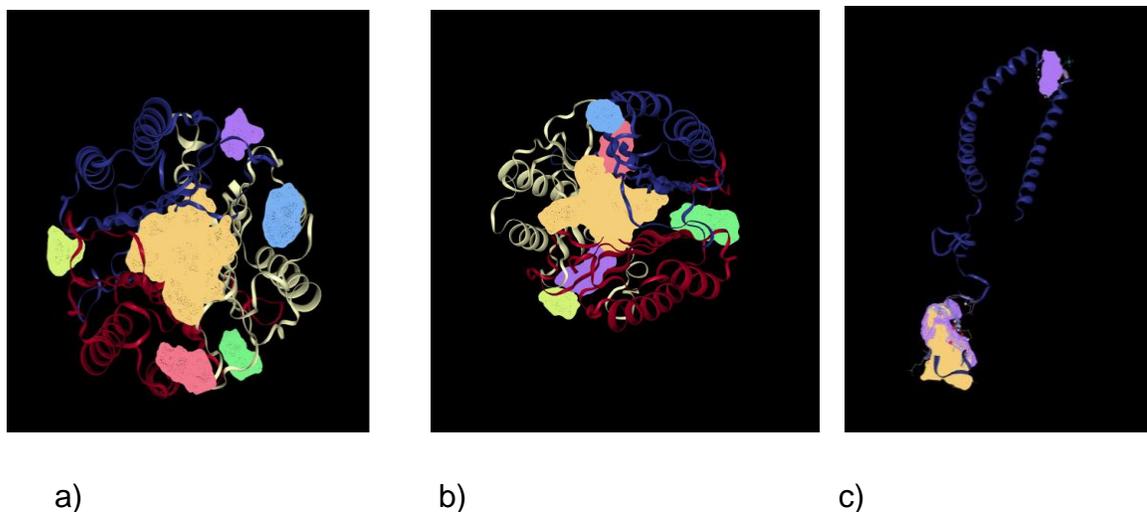


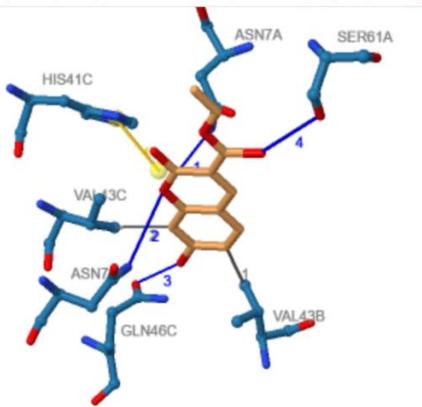
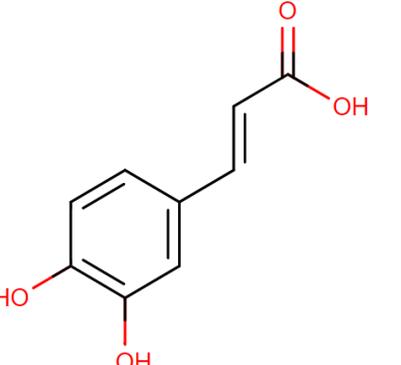
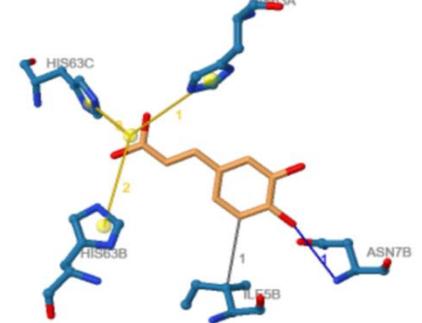
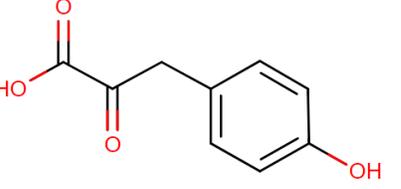
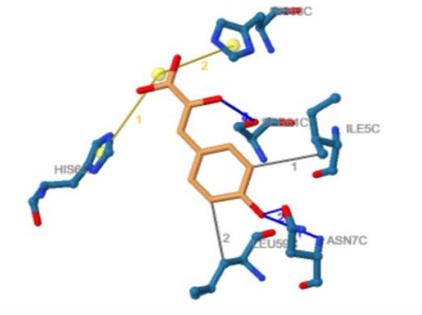
Figura 5-8 Detección de cavidades, posibles sitios de unión de ligandos para el modelo 1(a), modelo 2(b) de MIF y modelo de SNCA(c)

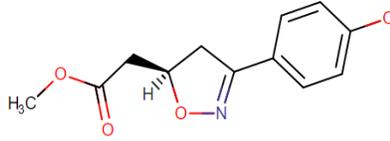
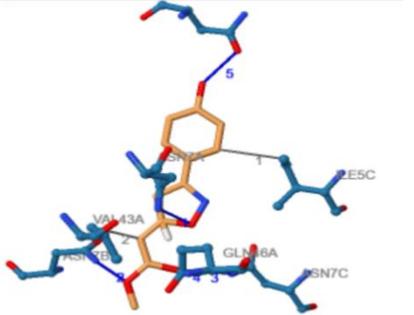
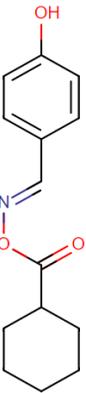
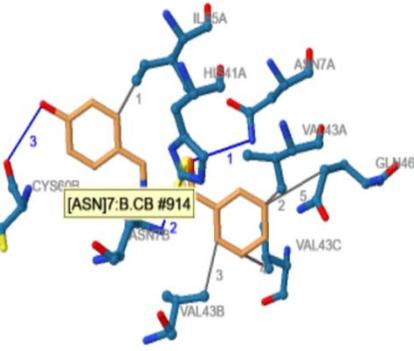
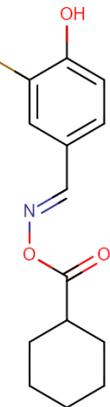
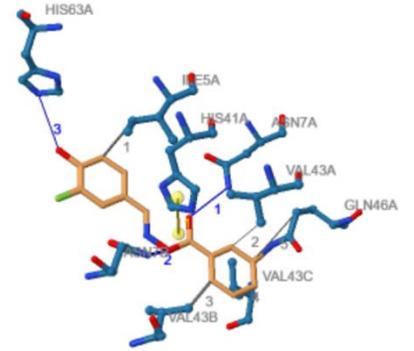
Tabla 5-2 Parámetros de las cavidades detectadas para el modelo 1 y 2 de MIF y modelo de SNCA presentada en la figura 5-9.

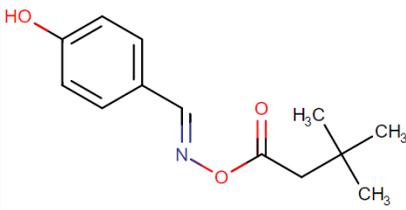
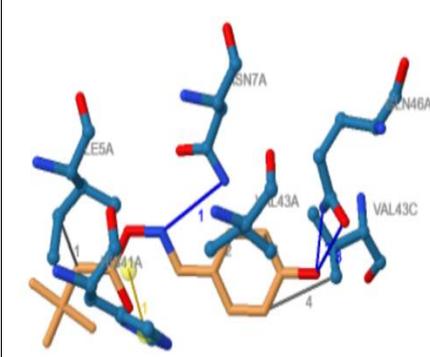
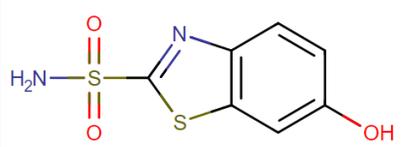
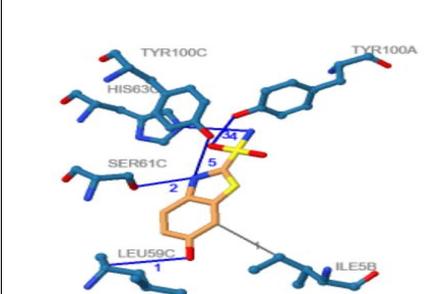
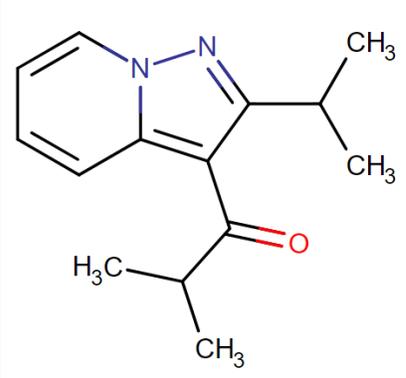
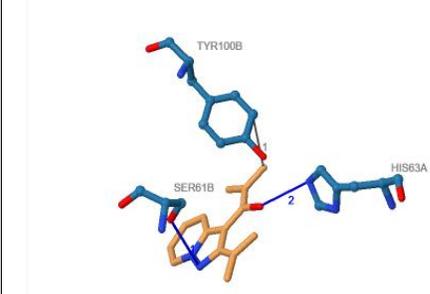
Proteína-Estructura-cavidad	Volumen	Área	Farmacibilidad
MIF-Modelo 1-beige	1569,79	1258,17	0,81
MIF-Modelo 1-violeta	155,26	301,86	0,32
MIF-Modelo 1-verde	149,12	341,53	0,25
MIF-Modelo 1-rosado	147,71	367,41	0,39
MIF-Modelo 1-azul	133,18	292,99	0,25
MIF-Modelo 1-verde limón	132,35	303,63	0,23
MIF-Modelo 2-beige	1337.02	1163.61	0.81
MIF-Modelo 2-violeta	247.42	394.26	0.59
MIF-Modelo 2-verde	217.28	298.41	0.51
MIF-Modelo 2-rosado	198.91	257.07	0.41
MIF-Modelo 2-azul	112.77	259.96	0.25
MIF-Modelo 2-verde limón	102.53	207.32	0.16
SNCA-Modelo-amarillo	451,87	1167,42	0.72
SNCA-Modelo-rosado	256,63	628.17	0.22

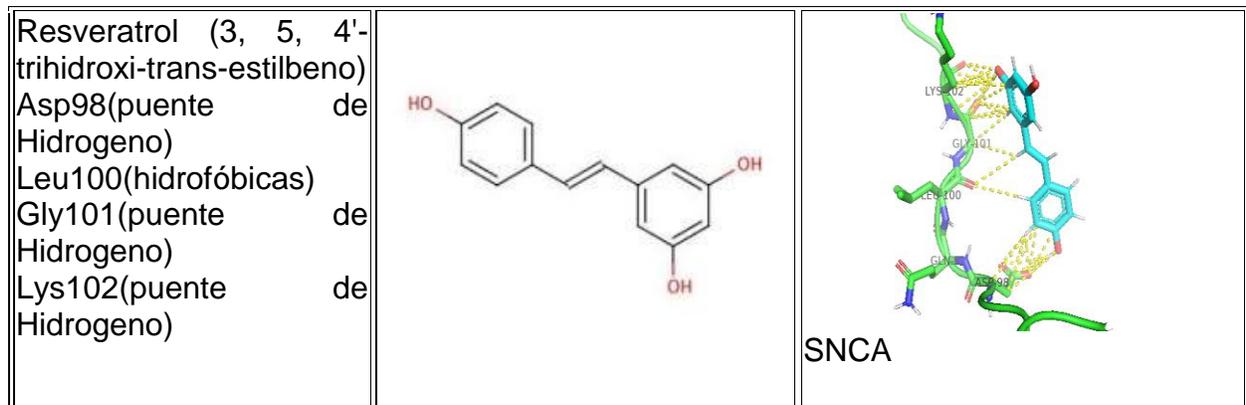
Luego se procedió a la búsqueda de ligandos para la cavidad seleccionada. En la base de datos del banco de fármacos se buscó los productos (ligandos) relacionados con las proteínas de interés (MIF y SNCA), los cuales se enlistan a continuación en la tabla 5-3. Luego se realizó el análisis de la interacción del modelo 2 de la proteína MIF y el ligando seleccionado (fármaco o candidato a fármaco, 9 estructuras), igual forma para el modelo de SNCA y un único ligando (resveratrol) mediante el programa PATCHDOCK (o Dockthor) disponible en La identificación de las interacciones no covalentes entre la proteína y ligando se realizó con el programa Protein-Ligand Interaction Profiler disponible en <https://plip.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>.

Tabla 5-3 Ligandos de MIF (homotrímero con cadenas a, b y c), representación 3D de la interacción del sitio de unión de MIF y diversos ligandos y de SNCA con un único ligando.

Compuesto ligando e interacciones con la proteína con coordinadas	Formula estructural del ligando	Interacción proteína-ligando
<p>7-Hydroxy-2-Oxo-Chromene-3-Carboxylic Acid Ethyl Ester</p> <p>Hidrofóbicas: 43b Val, 43c Val Puentes de H: 7a Asn, 7c Asn, 46c Gln, 61a Ser Puentes salinos: 41c His</p>		 <p>MIF</p>
<p>3,4-Dihydroxycinnamic Acid</p> <p>Hidrofóbicas: 5b Ile Puentes de H: 7b Asn Puentes salinos. 63a, 63b, 63c His</p>		 <p>MIF</p>
<p>4-Hydroxyphenylpyruvic acid (ENO)</p> <p>Hidrofóbicas:5c Ile, 59c Leu Puentes de H: 7c Asn, 7c Asn, 61 c Ser, 61c Ser Puentes salinos: 63B y 63C His</p>		 <p>MIF</p>

<p>3-(4-HYDROXYPHENYL)-4,5-DIHYDRO-5-ISOXAZOLE-ACETIC ACID METHYL ESTER</p> <p>Hidrofóbicas: 5c Ile, 43a Val</p> <p>Puentes de H. 7a Asn, 7b Asn, 7c Asn, 46a Gln, 98a Asn</p>		 <p>MIF</p>
<p>4-HYDROXYBENZALDEHYDE O-(CYCLOHEXYLCARBONYL)OXIME</p> <p>Hidrofóbicas: 5a Ile, 43a Val, 43b Val, 43c Val, 46a Gln</p> <p>Puentes de H: 7a Asn, 7b Asn, 60b Cys</p> <p>Puentes salinos: 41 a His</p>		 <p>MIF</p>
<p>3-FLUORO-4-HYDROXYBENZALDEHYDE O-(CYCLOHEXYLCARBONYL)OXIME</p> <p>Hidrofobic: 5 a Ile, 43 a val, 43B val, 43C val, 46 a Gln</p> <p>Puente de H: 7 a asn, 7b asn, 6 a his</p> <p>Salinos: 41 a his</p>		 <p>MIF</p>

<p>4-HYDROXYBENZALDEHYDE O-(3,3-DIMETHYLBUTANOYL) OXIME</p> <p>Hidrofóbicas: 5 a Ile, 43 a Val, 43 a Val, 43c Val</p> <p>Puente H: 7 a Asn, 46 a Gln, 46a Gln</p> <p>Salino 41 a His</p>		 <p>MIF</p>
<p>6-HYDROXY-1,3-BENZOTHAZOLE-2-SULFONAMIDE</p> <p>Hidrofóbicas: 5B Ile</p> <p>Puentes de H: 59C Leu 61C Ser, 63 C His, 100A Tyr, 100c Tyr</p>		 <p>MIF</p>
<p>3-isobutyl-2-isopropylpyrazolo-[1,5-a]pyridine (ibudilast).</p> <p>Tyr 100B (hidrofóbicas) Ser 61B (puente de Hidrogeno) His 63A (puente de Hidrogeno)</p>		 <p>MIF</p>



5.5 Discusión de resultados:

De la base de datos de UNIPROT se obtuvo las secuencias aminoacídicas de MIF y SNCA humanos. Para la construcción de los modelos 3D, en el programa blast se comparó estas secuencias con secuencias de proteínas con estructuras tridimensionales depositadas en el banco de proteínas (PDB), en donde ya han sido sometidas varias estructuras de nuestras proteínas objetivo. Basándonos en la similitud, en este caso, del 100%, seleccionamos nuestras proteínas templete para construir nuestros modelos, los cuales fueron dos para cada proteína. Los modelos tridimensionales se construyeron con el programa Modeller a partir de la estructura primaria. Los dos modelos seleccionados para cada proteína tienen una gran similitud entre sí. Para MIF en el análisis de estructura secundaria de la secuencia de cada subunidad se observan entre 4 y 6 estructuras alfa y entre 3 y 7 estructuras beta, respectivamente, dependiendo del programa de análisis. Por otro lado, los modelos obtenidos muestran 4 estructuras hélice alfa y 5 estructuras hoja plegada beta, valores que están comprendidos por los predichos por los programas empleados. Para SNCA su estructura secundaria muestra dos regiones con hélices alfa y una con plegamiento beta, lo que coincide con el predictor y la estructura descargada y observada con pymol. No hay que olvidar

que los algoritmos de reconocimiento de estructuras secundarias de PYMOL son bastantes sencillos comparados con los programas especializados, aunque las diferencias fueron mínimas y por tanto podemos suponer que no afectarían los posibles sitios de unión con los ligandos seleccionados (fármacos o candidatos a fármaco).

En la validación de los modelos, inicialmente se analizaron los gráficos de Ramachandran en donde la mayoría de los residuos estaban en regiones favorables con valores entre el 96 y 98 %, mientras el porcentaje de residuos en regiones desfavorables oscilaba entre 0,29 y 0,30 para el modelo 1 y 2 de MIF, respectivamente. El modelo 2 tenía 5% menos de valores atípicos de rotámeros que el modelo 1. Según estos datos, los dos modelos generados son de excelente calidad. Por otro lado, para los modelos de SNCA se observaron que un 91 y 88,41 % de los residuos de aminoácidos en regiones favorables, este último menor del 90 % para considerarlos de excelente calidad y con valores mayores de residuos en regiones desfavorables. Los dos modelos de SCNA son de menor calidad, si los comparamos con los modelos de la proteína MIF. Por otro lado, con el programa ProSa se calculó una puntuación Z general de la calidad del modelo, nos indica que la estructura de los modelos está dentro del rango de puntuaciones que se encuentran normalmente para proteínas nativas de tamaño similar, pues sus valores fueron muy cercanos al obtenido para la proteína molde, $z=-6,2$ en el caso de MIF. Para SNCA los valores fueron menores a los de la proteína de referencia, lo que evidencia menor calidad de los modelos si lo comparamos con MIF.

Con el programa Verify 3D se analizó la compatibilidad del modelo tridimensional con la secuencia de aminoácidos, es decir con su estructura primaria. Cada aminoácido recibe una puntuación que oscila entre -1 (mala) y +1 (buena). Para los modelos 1 y 2, cerca del 95 % de los residuos de aminoácidos tuvieron una puntuación mayor a 0,2 y el 100 % de residuos tuvieron una puntuación mayor a 0,2, respectivamente. Estos valores superiores a cero nos indican que los

modelos presentan compatibilidad 1D-3D y que el segundo modelo es mejor que el primero. Para SNCA, el programa de análisis arrojó error, un hecho más que nos muestra la mala calidad del modelo.

A continuación, se compararon los modelos con el molde y se obtuvo la puntuación LDDT que expresan el porcentaje de distancias interatómicas presentes en la estructura molde que también se conservan en el modelo, un valor de '0' corresponde a 0 distancias conservadas y '1' a un modelo perfecto. En el caso de MIF, la mayoría de los valores fueron 1 o cercanos a 1, este resultado puede justificarse por el alto grado de identidad entre el molde y los modelos. En el caso de SNCA los valores fueron más cercanos a cero, lo que indica que los modelos no conservan las distancias interatómicas de la estructura molde, otra evidencia de la mala calidad de este modelo.

Los modelos fueron analizados en DoGSiteScorer para predecir cavidades en la superficie de la proteína en donde podrían ubicarse los átomos del ligando. En ambos modelos de MIF se detectaron 6 cavidades, una de ellas arrojó una puntuación de 0,81 de farmacibilidad. El modelo 2 presentó valores de farmacibilidad superiores al modelo 1. La farmacibilidad o drogabilidad es la propiedad de la proteína blanco de poseer una cavidad que permita la unión de una pequeña molécula tipo fármaco cumpliendo las reglas de Lipinski, que consisten en una serie de postulados de carácter empírico que permiten evaluar que tan adecuado resultaría un compuesto químico para cumplir una función farmacológica una vez tomado como fármaco (233).

Teniendo en cuenta los resultados del análisis de las gráficas de Ramachandran, de very3D-1D y Dogsitescover el mejor modelo de MIF correspondía al modelo 2. Ese modelo fue el seleccionado para realizar el modelamiento con las herramientas patchdock o DockDoctor, que son algoritmos de acoplamiento molecular que arroja una lista de complejos potenciales formados por la proteína

y los ligandos seleccionados por complementariedad de forma. En caso de SNCA, para el análisis de docking molecular se tomó la decisión de usar un modelo descargado del banco de proteínas, aunque algunos indicadores de su calidad no fueran del todo buenos.

De la búsqueda en drugbank, se obtuvieron varios compuestos que interaccionaban con las proteínas de interés, de estos se tiene poca información farmacológica. El primero, 7-Hydroxy-2-Oxo-Chromene-3-Carboxylic Acid Ethyl Ester, es un compuesto experimental que se une al sitio activo tautomerasa de MIF, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas(234). Los seis compuestos restantes se están investigando y tienen entre otras propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y afectan la respuesta inmune y ellos son: 3,4-dihydroxycinnamic acid; 4-hydroxyphenylpyruvic acid (eno); 3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole-acetic acid methyl ester; 4-hydroxybenzaldehyde o-(cyclohexylcarbonyl)oxime; 3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde o-(cyclohexylcarbonyl)oxime; 4-hydroxybenzaldehyde o-(3,3-dimethylbutanoyl)oxime; 6-hydroxy-1,3-benzothiazole-2-sulfonamide. Solamente un compuesto es fármaco, el 3-isobutyryl-2-isopropylpyrazolo-[1,5-a]pyridine, conocido también como ibudilast.

El ibudilast es un fármaco antiinflamatorio que se desarrolló inicialmente para el tratamiento del asma bronquial, pero que también se ha utilizado para indicaciones cerebrovasculares y oculares. Es un inhibidor no selectivo de varias fosfodiesterasas (PDE) y tiene una actividad antiinflamatoria variada, además de efectos neuro-protectores como la inhibición de NOS y disminución de las especies reactivas de oxígeno(235). El análisis enzimático indica que estos compuestos son inhibidores no competitivos de la actividad tautomerasa de MIF e interactúan en el mismo sitio de unión alostérico de AV411 (ibudilast) y AV1013 (análogo de ibudilast), hallazgos detectados por RMN. Además, experimentos con anticuerpos dirigidos contra los receptores de MIF indican que CXCR2 es el

principal blanco para los receptores de MIF que participan en quimiotaxis de células mononucleares de sangre periférica (236).

En estudios con animales, ibudilast redujo el consumo de alcohol en ratas y ratones dependientes del alcohol en casi un 50%. De esta manera el ibudilast se convirtió en un posible tratamiento para la dependencia del alcohol. Estos hallazgos se ampliaron a estudios preclínicos y de laboratorio en humanos sobre la utilidad del ibudilast para tratar el consumo problemático de alcohol y sugieren un mecanismo bioconductual a través del cual actúa el ibudilast, es decir, reduciendo la respuesta gratificante a las señales de alcohol en el cerebro que conducen a una reducción del consumo excesivo del mismo (235,237).

Para el caso de SNCA se encontró en el drugBank que el polifenol resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) es el principio activo reportado. Se ha informado de sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-cancerígenas in vitro, aunque su actividad in vivo no se ha confirmado debido a su baja biodisponibilidad. Quizás el mecanismo de acción sea mediado por EGFR quinasa, factor nuclear-kappaB (NFkB), proteína activadora 1 (AP-1), HIF-1alfa, transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3)(238,239). La inducción de la muerte celular es un sello distintivo del resveratrol. Además de su efecto neuro-protector estimulando la degradación de proteínas anormales como los beta amiloides y tau hiperfosforilada(240). Es interesante encontrar como el alcohol se relaciona con disbiosis en el organismo y la disbiosis con enfermedades neurodegenerativas, y ambas características están relacionadas con alteraciones en SNCA(241). Existen reportes del empleo del resveratrol en modelos animales que conducen a la reducción de la agregación y citotoxicidad de los oligómeros de SNCA con la reducción de la neuroinflamación y el estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren que el resveratrol tiene un potencial terapéutico prometedor para las enfermedades degenerativas y otras sinucleinopatías (242).

En este trabajo se obtuvieron dos modelos tridimensionales para MIF, un modelo descargado para SNCA, cuya validación arrojó resultados fiables identificándose posibles sitios de unión con fármacos o candidatos fármacos y sus interacciones de tipo débil.

6 Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Con el estudio de un solo gen o de una sola proteína no se puede explorar el mecanismo molecular de una enfermedad compleja como el alcoholismo o fenotipo similares (consumo problemático de alcohol), ni dilucidar el complejo patrón de correlación entre genes, metilación de promotores, niveles de ARNm, concentración de proteínas y fenotipos de la enfermedad. En el presente estudio, combinamos los datos de información genética de un marcador STR, de 28 variantes de nucleótido simple (SNV) en diez genes relacionados con respuesta inflamatoria, niveles de expresión de proteínas y ARNm, estado de metilación del promotor de algunos de ellos y el fenotipo de la enfermedad, para intentar encontrar candidatos a blanco terapéutico y así proporcionar una base útil para proponer una vía para mejorar el diagnóstico molecular y/o la terapia dirigida contra esta patología.

En el estudio se reportan por primera vez para población colombiana frecuencias génicas y genotípicas de todos los biomarcadores estudiados. De igual forma, se reportan por primera vez frecuencias de los SNVs de SNCA -2171, rs9242048519 y de TNFR1 rs1032563104, ausentes en las principales bases de datos especializadas. En el presente trabajo se evidencio que el alelo T del SNV rs1470654147 en el gen de IL6R1 está asociado a susceptibilidad al consumo problemático de alcohol, aunque no se ha encontrado asociación con genotipos particulares. Aunque, se encontró que el genotipo T/T en hombres en el marcador rs4149621 del gen TNFR1 este asociado a la protección hacia la susceptibilidad de consumo del alcohol. Por otro lado, los haplotipos en el promotor de los genes TNFR1 (GGTCT) e INFGR1 (AA) en hombres afectan la síntesis de mRNA en

monocitos y la concentración proteica en plasma contribuyendo a la protección al consumo problemático de alcohol. De igual forma se encontró que en el gen SNCA, el haplotipo CGCAGCAGG es un factor de protección contra el consumo problemático de alcohol.

La información sobre SNV's y haplotipos de estos genes es útil para perfilarlos como biomarcadores de la enfermedad. Aunque, otros estudios son necesarios para dilucidar las funciones exactas de los polimorfismos, sus interacciones con otros genes, factores de transcripción y con atributos ambientales para generar los respectivos fenotipos.

El modelo constituido con los marcadores tipo SNV de tres genes SNCA, IFNGR1 y MIF considerados como una sola variable explican mejor los resultados que si se consideraran solos o aditivamente. La interacción entre SNCA, MIF e IFNGR1 puede constituirse en un modelo de predicción de riesgo en la medición de susceptibilidad al consumo problemático de alcohol en la población universitaria colombiana estudiada.

En este trabajo evidenciamos en individuos con consumo problemático de alcohol la expresión génica diferencial hacia la baja en forma de ARNm para los genes TNFR1 y MIF y proteica para MIF, mientras se detecta expresión diferencial de las proteínas SNCA, IL6R1 y MIF dependiendo del sexo de los participantes, específicamente en hombres hacia la baja. En este estudio no se comprobó interacción entre genotipos y expresión diferencial de ARNm. Particularmente en este estudio se evidencio el papel de los polimorfismos de MIF en la susceptibilidad al consumo de alcohol, estado de metilación, el cambio de expresión de su ARNm y la concentración de proteína en plasma de casos con relación a los controles. Estos resultados pueden indicar que hay otros

mecanismos regulatorios postranscripcionales que afecten la síntesis de estas proteínas.

Nuestros datos indican que hay cambios de metilación en el promotor de los genes MIF y SNCA de los casos que conllevarían a disminución en la síntesis de mARN y proteína. De igual forma se evidencia una dependencia del grado de metilación del sexo de los participantes, siendo mayor en los hombres que en mujeres. También se observa este fenómeno en grupos etarios, siendo más metilados los promotores de casos menores de 30 años. Hay una concordancia entre estado de metilación y expresión génica.

En este estudio se obtuvieron dos modelos tridimensionales para la proteína MIF con validación fiable. Se detectaron dos sitios con alta probabilidad de unión con siete ligandos candidatos a fármacos. De igual forma, con un modelo descargado para SNCA se encontró un sitio de unión con el ligando resveratrol, candidato a fármaco en el tratamiento de sinucleopatías.

Los haplotipos en los genes SNCA, TNFR1 e INFR1 identificados son variantes funcionales que pueden afectar la susceptibilidad al consumo de riesgo de alcohol y fenotipos relacionados. Además, que su interacción parece ser fundamental para el establecimiento de estos fenotipos. Nuestro estudio proporciona información sobre la expresión y regulación de estos genes de respuesta inflamatoria en estos fenotipos de consumo problemático de alcohol.

RECOMENDACIONES

Una medida para fortalecer esta investigación es aumentar el tamaño de muestra para mejorar los datos de frecuencias alélicas y genotípicas, especialmente del marcador rep-1 en SNCA ya que el valor P fue cercano a la diferencia significativa.

De otros trabajos se muestra que existe una relación entre variantes del gen MIF, la repetición -794 CATT₅₋₈ (rs5844572) y el SNV -173 G>C (rs755622) y las tasas de transcripción, siendo transcripcionalmente más activo las formas largas (7 y 8 repeticiones) que las cortas (≤ 5) y la variante C que G, polimorfismos que no fueron evaluados en este trabajo, aunque valdría la pena tenerlos en cuenta en un futuro para mejorar la discusión de nuestros hallazgos en este gen.

Es preciso realizar la búsqueda de variantes no solo en la región promotora sino en la región codificante y en el extremo 3'UTR de los genes. Particularmente, algunas variantes en región codificante de SNCA se han relacionado con la mayor capacidad de agregación y citotoxicidad. Por otro lado, las variantes en la región 3' de algunos de los genes estudiados pueden influir en el fenotipo al afectar la expresión génica postranscripcionalmente.

Quizás podemos pensar en un evento de regulación postranscripcional que podría comprender disminución en la estabilidad del ARNm de TNFR1 en individuos con uso problemático del alcohol o eventos de regulación epigenética como la presencia de microRNAs tipo miRNA-19a y miRNA-103a, que se han encontrado alterados en varias patologías adictivas y relacionados con la regulación de la expresión de genes como TNF- α , TNFR1, TNFR2, CFLIP, TRADD, CASP3 y CASP8. Sería interesante a futuro poder explorar otros aspectos epigenéticos del alcoholismo y particularmente la presencia de microRNA's en pacientes con uso problemático de alcohol de origen colombiano.

Finalmente, teniendo en cuenta que ha aumentado la posibilidad de emplear metodologías de última generación, sería muy interesante plantear estudios con aproximaciones amplias para ver mayor número de marcadores, por ejemplo, hacer epigenómica, transcriptómica global de otros tipos de tejidos y genómica global.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS/MEDICINA**

**INSTITUTO DE GENÉTICA
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN DE MAYORES DE
EDAD EN EL ESTUDIO**

Bogotá D.C., _____ de 201_____

Yo _____ identificado(a) con cédula de ciudadanía N° _____ de _____, autorizo que se me tomó una muestra de sangre (5 centímetros cúbicos) lo cual conlleva un riesgo mínimo.

Mi muestra será usada en un estudio de asociación de varios genes que participan en la acción del alcohol en el cuerpo y cambios en estos genes están relacionados con dependencia o protección al alcoholismo. La muestra será empleada UNICAMENTE con fines diagnósticos y académicos. Me han hecho saber que es posible que se adelanten algunos procedimientos en otro país.

Se me ha informado sobre la garantía de CONFIDENCIALIDAD de este estudio. Los resultados de exámenes y la información que yo he dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente yo y el equipo de investigación tendremos acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin mi consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, mi nombre y los de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

Los resultados del estudio serán informados obligatoriamente a mí tan pronto se tengan. Así mismo se me ha informado que no presentaré molestias ni otros riesgos por fuera de la toma de la muestra ni recibiré beneficios económicos ni de

otro tipo y que puedo retirarme del estudio cuando lo desee, sin que esto tenga ninguna consecuencia para mí, únicamente con solicitarlo.

Finalmente, manifiesto que he leído y comprendido perfectamente lo anterior y que todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma y que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento.

Firma Participante

C.C.

Investigador Responsable

C.C.

Firma testigo 1

C.C.

Firma testigo 2

C.C.

7.2 ANEXO 2: Encuesta AUDIT

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS/ MEDICINA
AUDIT- ENCUESTA DE INCLUSIÓN**

e-mail: _____

Fecha _____

NOMBRES Y
APELLIDOS _____

Cédula _____

Lugar y fecha de
Nacimiento _____

Teléfono _____

INSTITUCIÓN A LA QUE PERTENECE _____

Marque con una **X** en el cuadro que mejor describa su respuesta a cada pregunta.

Sus respuestas serán confidenciales, así que sea honesto por favor.

PREGUNTAS	0	1	2	3	4
1. ¿Con qué frecuencia consumió o consume alguna bebida alcohólica?	Nunca	Una o menos veces al mes	De 2 a 4 veces al mes	De 2 a 3 más veces a la semana	4 o más veces a la semana
2. ¿Cuántas bebidas alcohólicas tomó o suele tomar en un día de consumo normal?	1 o 2	3 o 4	5 o 6	De 7 a 9	10 o más
3. ¿Con qué frecuencia toma o tomó 6 o más bebidas alcohólicas en un solo día?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario
4. ¿Con qué frecuencia en el curso del último	Nunca	Menos de una	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario

año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?		vez al mes			
5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario
6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario
7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario
8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?	Nunca	Menos de una vez al mes	Mensualmente	Semanalmente	A diario o casi a diario
9. ¿Usted o alguna otra persona ha resultado herido porque usted había bebido?	No		Sí, pero no en el curso del último año		Sí, el último año
10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario ha mostrado preocupación por un consumo de bebidas alcohólicas o le ha sugerido que deje de beber?	No		Sí, pero no en el curso del último año		Sí, el último año
				TOTAL	

7.3 Anexo 3 GUIÓN DE LA ENTREVISTA SOBRE CONSUMO DE ALCOHOL**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA****FACULTAD DE CIENCIAS/MEDICINA****INSTITUTO DE GENÉTICA****GUIÓN DE LA ENTREVISTA SOBRE CONSUMO DE ALCOHOL**

Bogotá D.C., _____ de 201____

Yo _____ identificado(a) con cédula de ciudadanía N° _____ de _____, voluntariamente contestare las preguntas contenidas en este formato. Las respuestas únicamente se emplearán de forma anónima en el estudio al que accedí a participar por consentimiento informado firmado previamente.

El objetivo de esta entrevista es conocer un poco más a fondo los temas relacionados con el consumo de alcohol (historia personal, familiar, hábitos de consumo, estado de salud etc.) de los individuos seleccionados por su puntaje AUDIT.

Nombre completo:

Lugar de nacimiento:

Puntaje AUDIT: _____ Cédula: _____ Sexo: _____

Edad: _____ Grado de escolaridad: _____

Grupo o fundación de ayuda: _____

Estrato socioeconómico: _____

Edad de inicio del consumo: _____

Tipo de bebida al inicio del consumo: _____

¿Qué y cuánto consume en una noche de rumba actualmente?:

Actualmente cumple con algún tratamiento médico:

Consumo de otro tipo de sustancias psicoactivas:

Enfermedades que ha padecido y/o padece actualmente:

Presenta algún tipo de alergia:

Consume algún medicamento en este momento:

Familiar con problemas de adicciones y/o alcoholismo:

Correo electrónico:

7.4 Anexo 4. Tabla S-1 Frecuencias alélicas mundiales y las reportadas en este trabajo.

Gen	SNV's	Varia nte	Europeo s	African os	Latino american os	Colombianos (reportadas por nuestro grupo)
SNCA	rs261936 3	T	0,28	0,06	0,14	0,21
		G	0,72	0,94	0,86	0,79
SNCA	rs989496 677	C	1	1	NA	1
		T	0	0	NA	0
SNCA	-2171	T	NA	NA	NA	0,71
		A	NA	NA	NA	0,29
SNCA	rs927159 023	G	1	1	NA	1
		C	0	0	NA	0
SNCA	rs924048 579	C	NA	NA	NA	0,99
		T	NA	NA	NA	0,01
SNCA	rs230113 4	G	0,51	0,33	0,59	0,53
		A	0,49	0,67	0,41	0,47
SNCA	rs950036 657	G	1	1	NA	1
		A	0	0	NA	0
SNCA	rs916862 395	G	1	1	NA	1
		C	0	0	NA	0
IL6R	rs484561 7	G	0,6	0,67	0,52	0,59
		A	0,4	0,33	0,48	0,41
IL6R	rs147065 4147	C	1	1	NA	0,84
		T	0	0	NA	0,16
iNOS	rs277924 8	T	0,61	0,55	0,70	0,65
		C	0,39	0,45	0,30	0,35
IFNGR 1	rs121913 171	G	1	1	1	0,97
		A	0	0	0	0,03
IFNGR 1	rs171814 57	G	0,92	0,98	NA	0,93
		A	0,08	0,02	NA	0,07
IFNGR 1	rs223471 1	A	0,60	0,5	NA	0,61
		G	0,40	0,5	NA	0,39

IFNGR 1	rs774939 0	G	0,40	0,50	0,38	0,39
		A	0,60	0,50	0,62	0,61
IFNAR 1	rs285001 5	C	0,72	0,95	0,68	0,54
		T	0,28	0,05	0,32	0,46
IL12RB 1	rs436857	G	0,80	0,85	0,88	0,91
		A	0,20	0,15	0,12	0,09
IL12RB 1	rs393548	T	0,79	0,80	NA	0,88
		A	0,21	0,20	NA	0,12
TNFR1	rs103092 0578	G	1	1	NA	1
		A	0	0	NA	0
TNFR1	rs103256 3104	G	NA	NA	NA	1
		T	NA	NA	NA	0
TNFR1	rs414962 1	T	0,99	0,52	0,90	0,81
		C	0,01	0,48	0,10	0,19
TNFR1	rs414957 0	C	0,60	0,89	0,72	0,87
		A	0,40	0,11	0,28	0,13
TNFR1	rs223464 9	T	0,99	0,91	NA	0,98
		G	0,01	0,09	NA	0,02
MIF	rs893482 429	G	0	0	NA	0,05
		C	1	1	NA	0,95
RELA	rs103934 7100	T	1	1	1	1
		A	0	0	0	0
RELA	rs139488 9070	G	1	1	1	1
		T	0	0	0	0
HMGB 1	rs414770 46	G	0.99930	1	1	1
		A	0	0	0	0
		T	0.0007	0	0	0

7.5 Anexo 5: Tabla S-2. CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRAFICAS DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO (n=139, 73 controles y 66 casos)

Característica	Grupo	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Total n (%)
Rango etario (años)				
18-30	Controles	27 (37)	33 (45)	60 (82)
	Casos	26 (39)	15 (23)	41 (62)
31-50	Controles	5 (7)	6 (8)	11 (15)
	Casos	11 (17)	11 (17)	22 (34)
≥51	Controles	2 (3)	0 (0)	2 (3)
	Casos	3 (5)	0 (0)	3 (5)
Total	Controles	34 (47)	39 (53)	73 (100)
	Casos	40 (61)	26 (39)	66 (100)
Puntaje AUDIT				
0-7	Controles	39(53)	34(47)	73(100)
8-12	Casos	6(9)	2(8)	8(17)
13-19	Casos	15(23)	8(12)	23(35)
20-40	Casos	19(29)	16(24)	35(53)
Total	Casos	40(61)	26(39)	66(100)
Edad de inicio del consumo de alcohol				
0-18	Controles	27(37)	32(44)	59(81)
	Casos	36(55)	18(27)	54(82)
>18	Controles*	6(8)	3(4)	9(12)
	Casos	4(6)	8(12)	12(18)
Total	Controles*	33(45)	35(53)	68(93)
	Casos	40(61)	26(39)	66(100)
*5(7%) individuos controles nunca han consumido bebidas alcohólicas				
Gramos de alcohol consumidos por episodio de consumo	Controles	74,11±57,79	58,07±54,44	65,64±56,21
	Casos	291,87±114,55	336,26±108,43	309,35±113,46
Consumo de otras sustancias psicoactivas				
Controles	Si	4(5)	11(15)	15(20)
	No	20(27)	15(21)	35(48)
	No sabe/No responde	10(14)	13(18)	23(32)
	Total	34(46)	39(54)	73(100)
Casos	Si	30(45)	8(12)	38(56)
	No	4(6)	3(5)	7(11)
	No sabe/No responde	6(9)	15(23)	21(32)
	Total	40(60)	26(40)	66(100)
Familiares con problemas de consumo				

Controles	Si	12(16)	16(22)	28(38)
	No	15(21)	10(14)	25(34)
	No sabe/ No responde	7(10)	13(18)	20(27)
	Total	34(47)	39(53)	73(100)
Casos	Si	9(14)	5(8)	14(22)
	No	3(5)	2(3)	5(8)
	No sabe/ No responde	28(42)	19(29)	47(71)
	Total	40(61)	26(39)	66(100)

7.6 Anexo 6: Tabla S-3. Frecuencias genotípicas en controles e individuos con uso problemático del alcohol

Gen-SNV Número rs	Genotipo	Controles	Alcoholes dependientes	*Chi cuadrado (P valor)
SNCA rs2619363 n=85	AA	1	4	2,892 (0,235)
	CA	15	11	
	CC	32	22	
SNCA rs542037441 n=93	CC	53	39	0,730 (1,00)
	CG	1	0	
SNCA rs989496677 n=93	GG	54	39	Mono- mórfico
SNCA -2171 n=93	AT	27	27	0,270 (0,298)
	TT	24	15	
SNCA rs927159023 [-2159] n=91	CC	54	37	Mono- Mórfico
SNCA rs924048579 [-2141] n=93	CC	54	38	0,237 (0,419)
	CT	0	1	
SNCA rs2301134 [-2127] n=93	CC	15	10	2,570 (0,277)
	CT	31	18	
	TT	8	11	
SNCA rs950036657 n=95	CC	57	38	Mono- Mórfico
SNCA rs916862395 n=96	CC	54	42	Mono- Mórfico
IL6R rs4845617 n=68	GG	8	10	1,020 (0,600)
	GA	20	24	
	AA	4	2	
IL6R rs1470654147 n=70	CC	28	22	3,039 (0,218)
	CT	6	12	
	TT	0	2	
iNOS rs2779248 n=59	CC	4	5	0,543 (0,762)
	CT	8	15	
	TT	12	15	
IFNGR1 rs121913171 n=77	CC	36	37	0,001 (0,979)
	CT	2	2	

IFNGR1 rs17181457 n=80	CC	35	31	3,333 (0,189)
	CT	5	6	
	TT	0	3	
IFNGR1 rs2234711 n=66	CC	6	3	1,161 (0,560)
	CT	16	17	
	TT	14	10	
IFNGR1 rs7749390 n=70	GG	16	12	0,632 (0,729)
	AG	16	18	
	AA	4	4	
IFNAR1 rs2850015 n=72	CC	4	28	7,8231 (0,020)
	CT	14	18	
	TT	2	6	
IL12RB1 rs436857 n=70	GG	27	31	1,886 (0,212)
	GA	3	9	
IL12RB1 rs393548 n=70	TT	24	29	0,524 (0,469)
	TA	6	11	
TNFR1 rs1030920578 n=78	CC	54	24	Mono- Mórfico
TNFR1 rs1032563104 n=78	CC	42	36	Mono- Mórfico
TNFR1 rs4149621 n=74	GG	6	6	2,304 (0,315)
	GA	0	4	
	AA	32	26	
TNFR1 rs4149570 n=62	GG	28	24	1,519 (0,467)
	GT	4	0	
	TT	4	2	
TNFR1 rs2234649 n=46	AA	17	23	3,486 (0,090)
	AC	5	1	
MIF rs893482429 n=56	CC	21	30	1,475 (0,478)
	CT	2	2	
	TT	1	0	

*Chi cuadrado de Pearson (p valor, 5% de significancia)

Bibliografía

1. OCDE. Panorama de la Salud: Latinoamérica y el Caribe 2020. 2020.
2. Winstock A. Global Drug Survey 2019 Executive Summary. 2019;8.
3. Protección M de S y, Social. ESTRATEGIA NACIONAL DE RESPUESTA INTEGRAL FRENTE AL CONSUMO DE.
4. Méndez C, Rey M. Caracterización de polimorfismos de los genes ADH2, ADH3, ALDH2 y CYP2E1 y su relación con el alcoholismo en una población colombiana. *Colomb Med.* 2015;46(4):176–82.
5. Ximena T, Matiz C, Aristizabal FA, Buitrago MR. Determination of Genetic Polymorphism Taqia (Ankk1) Taqib (Drd2), -141c Ins / Del (Drd2) And 40 Bp Vntr (Slc6a3) in the Colombian Population and Evaluation of their Associations with Alcoholism. *J Subst Abus Alcohol.* 2015;3:1–9.
6. Martínez-Rodríguez TY, Rey-Buitrago M. Expresión de alfa sinucleína en sangre y su relación con el estreñimiento crónico en población residente en Bogotá, D.C., con problemas de consumo de alcohol. *Biomédica.* 2020;40(2):309–21.
7. World Health Organization. Glosario de términos de alcohol y drogas. In: *Glosario de términos de alcohol y drogas.* 2nd ed. Organización Mundial de la Salud; 1994. p. 60.
8. Babor TF, Higgins-biddle JC, Saunders JB, Monteiro MG. Cuestionario de Identificación de los Transtornos debidos al Consumo de Alcohol. In: *Organización Mundial de la Salud [Internet].* 2001. p. 1–40. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/activities/en/AUDITmanualSpanish.pdf

9. organización panamericana de la salud. CIE-10 clasificacion estadistica internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. 554 [Internet]. 2008;3(554):758. Available from: <http://ais.paho.org/classifications/Chapters/pdf/Volume3.pdf>
10. Organización Panamericana de la Salud. Alcohol y salud publica en las Americas Un Caso Para La Accion. Organ Panam La Salud World Heal Organ. 2007;64.
11. Szerman N, Roncero C, Casas M. Protocolos de intervención. In: PROTOCOLOS DE INTERVENCIÓN EN PATOLOGÍA DUAL. Sociedad española de patología dual; 2016. p. 297.
12. Kreek MJ, Nielsen DA, Laforge KS. Genes Associated With Addiction. *NeuroMolecular Med.* 2004;85(5).
13. Higuchi S, Matsushita S, Masaki T, Yokoyama A, Kimura M, Go S, et al. Influence of genetic variations of ethanol-metabolizing enzymes on phenotypes of alcohol-related disorders. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004. p. 472–80.
14. Vigilancia I De. Microarrays y Biochips de ADN. Vol. 1, Revista Panamericana de Salud P. 2002. 56 p.
15. Daudén Tello E. Farmacogenética II. Métodos moleculares de estudio, bioinformática y aspectos éticos. Vol. 98, *Actas Dermo-Sifiliograficas.* 2007. p. 3–13.
16. Rey M, Gutiérrez A, Schroeder B, Usaquén W, Carracedo A, Bustos I, et al. Allele frequencies for 13 STR's from two Colombian populations: Bogotá and Boyacá. *Forensic Sci Int.* 2003;136(1–3):83–5.
17. Enoch M-A. Genetic Influences on the Development of Alcoholism. *Curr Psychiatry Rep* [Internet]. 2013;15(11):412. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11920-013-0412-1>
18. Heinz a. Dopaminergic dysfunction in alcoholism and schizophrenia-- psychopathological and behavioral correlates. *Eur Psychiatry.* 2002;17(1):9–

- 16.
19. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: Brain circuits and treatment strategies. Vol. 47, *Neuropharmacology*. 2004. p. 3–13.
20. Flatscher-Bader T, Harrison E, Matsumoto I, Wilce PA. Genes associated with alcohol abuse and tobacco smoking in the human nucleus accumbens and ventral tegmental area. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(7):1291–302.
21. Kimura M, Higuchi S. Genetics of alcohol dependence. Vol. 65, *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2011. p. 213–25.
22. Köhnke MD, Batra A, Kolb W, Köhnke AM, Lutz U, Schick S, et al. Association of the dopamine transporter gene with alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(5):339–42.
23. Enoch M-A, Xu K, Ferro E, Harris CR, Goldman D. Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism. *Psychiatr Genet*. 2003;13:33–41.
24. Choi IG, Kee BS, Son HG, Ham BJ, Yang BH, Kim SH, et al. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase, dopamine and serotonin transporters in familial and non-familial alcoholism. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006;16(2):123–8.
25. Huang CLC. The role of serotonin and possible interaction of serotonin-related genes with alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase genes in alcohol dependence-a review. *Am J Transl Res*. 2010;2(2):190–9.
26. Xuei X, Dick D, Flury-Wetherill L, Tian H-J, Agrawal A, Bierut L, et al. Association of the kappa-opioid system with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*. 2006;11(11):1016–24.
27. Izquierdo M. Intoxicación alcohólica aguda. Vol. 14, *Adicciones*. 2002. p. 175–93.
28. Gelernter J, Kranzler HR, Sherva R, Almasy L, Koesterer R, Smith AH, et al. Genome-wide association study of alcohol dependence: significant findings in African- and European-Americans including novel risk loci. *Mol*

-
- Psychiatry. 2014;19(1):41–9.
29. Barrios De Tomasi E, Juárez-González J. Antagonistas opioides y consumo de alcohol. Vol. 45, Revista de Neurología. 2007. p. 155–62.
 30. Ayesta FJ. Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. Vol. 14, Adicciones. 2002. p. 63–78.
 31. Ron D, Wang J. The NMDA Receptor and Alcohol Addiction [Internet]. Biology of the NMDA Receptor. 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204417>
 32. Sander T, Ostapowicz A, Samochowiec J, Smolka M, Winterer G, Schmidt LG. Genetic variation of the glutamate transporter EAAT2 gene and vulnerability to alcohol dependence [Internet]. Vol. 10, Psychiatric Genetics. 2000. p. 103–7. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034508242&partnerID=tZOtx3y1>
 33. Heilig M, Goldman D, Berrettini W, O'Brien CP. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. Nat Rev Neurosci. 2011;12(11):670–84.
 34. Wong CCY, Mill J, Fernandes C. Drugs and addiction: An introduction to epigenetics. Addiction. 2011;106(3):480–9.
 35. Hodgkinson CA, Yuan Q, Xu K, Shen P, Heinz E, Lobos EA, et al. Addictions Biology : Haplotype-Based Analysis for 130 Candidate Genes on a Single Array. 2008;43(5):505–15.
 36. Treutlein J, Cichon S, Ridinger M, Wodarz N, Soyka M, Zill P, et al. Genome-wide association study of alcohol dependence. Arch Gen Psychiatry. 2009;66(7):773–84.
 37. Tabakoff B, Saba L, Printz M, Flodman P, Hodgkinson C, Goldman D, et al. Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans. BMC Biol. 2009;7:70.
 38. Bierut LJ, Agrawal A, Bucholz KK, Doheny KF, Laurie C, Pugh E, et al. A

- genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5082–7.
39. Foroud T, Ph D, Edenberg HJ, Ph D, Crabbe JC, Ph D. MAA Publications. *Am Math Mon*. 1967;74(4):482–3.
 40. Kapoor M, Wang J, Wetherill L, Le N, Bertelsen S, Hinrichs AL, et al. Identify Novel Loci for Maximum Number of Alcoholic Drinks. 2014;132(10):1141–51.
 41. Zhang R, Miao Q, Wang C, Zhao R, Li W, Haile CN, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol*. 2013;18(2):392–403.
 42. Lossie AC, Muir WM, Lo CL, Timm F, Liu Y, Gray W, et al. Implications of genomic signatures in the differential vulnerability to fetal alcohol exposure in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Front Genet*. 2014;5(JUN).
 43. Levey DF, Le-Niculescu H, Frank J, Ayalew M, Jain N, Kirilin B, et al. Genetic risk prediction and neurobiological understanding of alcoholism. *Transl Psychiatry*. 2014;4(January).
 44. Zuo L, Tan Y, Zhang X, Wang X, Krystal J, Zhong C, et al. dependence. 2017;39(8):1388–95.
 45. Gelernter J, Renato P, Stein MB. Genome-wide Association Study of Maximum Habitual Alcohol Intake in >140,000 U.S. European and African American Veterans Yields Novel Risk Loci. *Biol Psychiatry*. 2019;86(5):365–76.
 46. Kapoor M, Wang J, Farris SP, Liu Y, McClintick J, Gupta I, et al. Analysis of whole genome-transcriptomic organization in brain to identify genes associated with alcoholism. 2019;
 47. Kranzler, HR, Zhou, H., Kember R y col. Genome-wide association study of alcohol consumption and use disorder in 274,424 individuals from multiple populations _ Enhanced Reader.pdf. 2019.
 48. Zhou H, Sealock JM, Sanchez-roige S, Clarke T, Daniel F, Cheng Z, et al. Nature neuroscience. *Nat Neurosci*. 2020;23(7):809–18.

-
49. Kapoor M, Chao MJ, Johnson EC, Novikova G, Lai D, Meyers JL, et al. Multi-omics integration analysis identifies novel genes for alcoholism with potential overlap with neurodegenerative diseases. (2021):1–12.
 50. Singh SM, Treadwell J, Kleiber ML, Harrison M, Uddin RK. Analysis of behavior using genetical genomics in mice as a model: From alcohol preferences to gene expression differences. *Genome*. 2007;50(10):877–97.
 51. Alfred J. Robison and Eric J. Nestler. Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2012;12(11):623–37.
 52. Vagga A, Meshram A, Kanyal L, Meshram K. Gene expression regulation by epigenetic mechanism an emerging way in alcoholics. *Int J Curr Res Rev*. 2021;13(3).
 53. Jing Li¹, Yunhui Cheng, Weiliang Bian, Xiaojun Liu¹, Chunxiang Zhang and JY. Region-specific Induction of FosB/ Δ FosB by Voluntary Alcohol Intake: Effects of Naltrexone. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;34(10):1742–50.
 54. Nennig SE, Schank JR. The role of NFkB in drug addiction: Beyond inflammation. *Alcohol Alcohol*. 2017;52(2):172–9.
 55. Chen X, Gao B, Ponnusamy M, Lin Z, Liu J. MEF2 signaling and human diseases. 2017;8(67):112152–65.
 56. Wand G. The anxious amygdala : CREB signaling and predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2697–9.
 57. Kevin Range and DMYAM. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2012;23(1):1–7.
 58. Sohma H, Hashimoto E, Shirasaka T, Tsunematsu R, Ozawa H, Boissl KW, et al. Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 1999;1454(1):11–8.
 59. Zhang H, Herman AI, Kranzler HR, Anton RF, Zhao H, Zheng W, et al. Array-based profiling of dna methylation changes associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;37(SUPPL.1):1–13.

60. Franklin TB, Mansuy IM. Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010;39(1):61–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.012>
61. Lian G, Peng S, Zhao Q, Xu Y, Lin X. Reversing Epigenetic Alterations Caused by Alcohol : A Promising Therapeutic Direction for Alcoholic Liver. 2018;42(10):1863–73.
62. Popescu A, Marian M, Drăgoi A, Costea R-V. Understanding the genetics and neurobiological pathways behind addiction (Review). *Exp Ther Med*. 2021;21(5):1–10.
63. Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Su J, et al. NIH Public Access. 2015;23(2):223–33.
64. Girardot M, Feil R, & David Lières. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics*. 2013;5(6):715–728.
65. Kerton O. DNA Methylation - From Genomics to Technology. *DNA Methylation - From Genomics to Technology*. 2012.
66. NIAAA. Epigenetics: A New Frontier for Alcohol Research In. *Nih*. 2002;86(58):1–6.
67. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: A novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol*. 2002;321(4):591–9.
68. Lehrmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG, Lowe R, Huestis MA, et al. Transcriptional changes common to human cocaine cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One*. 2006;1(1).
69. Amul J Sakharkar, Huaibo Zhang, Lei Tang, Guangbin Shi and SCP. Histone Deacetylases (HDAC)-Induced Histone Modifications in the Amygdala: A Role in Rapid Tolerance to the Anxiolytic Effects of Ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36(1):61–71.
70. Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res Curr*

- Rev. 2012;35(1):6–16.
71. Meng, F., Glaser, S. S., Francis, H., Yang, F., Han, Y., Stokes, A., Staloch, D., McCarra, J., Liu, J., Venter, J., Zhao, H., Liu, X., Francis, T., Swendsen, S., Liu, C. G., Tsukamoto, H., & Alpini G. Epigenetic regulation of miR-34a expression in alcoholic liver injury. *Am J Pathol.* 2012;181(3):804–17.
 72. Hamilton PJ, Nestler EJ. Epigenetics and addiction. *Curr Opin Neurobiol.* 2019;59:128–36.
 73. Wasielewski JA, Holloway FA. Alcohol’s interactions with circadian rhythms - A focus on body temperature. *Alcohol Res Heal.* 2001;25(2):94–100.
 74. Andrés G, Ashour N, Sánchez-Chapado M, Ropero S, Angulo JC. The study of DNA methylation in urological cancer: Present and future. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2013;37(6):368–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2013.03.001>
 75. McKay HRKR. Personalized treatment of alcohol dependence. *Curr Psychiatry Rep.* 2012;14(5):486–493.
 76. Becerril-Villanueva E, Moreno-Aguilar J, Mendieta-Cabrera D, González-Cruz D, Natera-Rey G, Pavón-Romero L, et al. Estudio preliminar de la expresión del mensaje genético del transportador de serotonina en células mononucleares de sangre periférica en pacientes con dependencia al alcohol con y sin depresión mayor comórbida. *Salud Ment.* 2011;34(2):139–47.
 77. Agrawal RG, Owen JA, Levin PS, Hewetson A, Berman AE, Franklin R, et al. NIH Public Access. 2015;38(2):428–37.
 78. Fuller RK, Branchey L, Brightwell DR, Derman RM, Emrick CD, Iber FL, et al. Disulfiram Treatment of Alcoholism: A Veterans Administration Cooperative Study. *JAMA J Am Med Assoc.* 1986;256(11):1449–55.
 79. Caputo F, Vignoli T, Grignaschi A, Cibirin M, Addolorato G, Bernardi M. Pharmacological management of alcohol dependence: From mono-therapy to pharmacogenetics and beyond. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet].

- 2014;24(2):181–91. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.10.004>
80. Whitworth AB, Fischer F, Lesch OM, Nimmerrichter A, Oberbauer H, Platz T, et al. Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *Lancet*. 1996;347(9013):1438–42.
 81. Kranzler HR, Van Kirk J. Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: A meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(9):1335–41.
 82. Selin J. Implementation of substitution treatment in Finland: Beyond rationalisation and medicalisation. *NAD Publ*. 2011;28(1):29–42.
 83. Camilleri M. Pharmacogenomics and serotonergic agents: Research observations and potential clinical practice implications. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19(SUPPL.2):40–5.
 84. Pettinati HM, Volpicelli JR, Kranzler HR, Luck G, Rukstalis MR, Cnaan A. Sertraline treatment for alcohol dependence: Interactive effects of medication and alcoholic subtype. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(7):1041–9.
 85. Caputo F, Francini S, Brambilla R, Vigna-Taglianti F, Stoppo M, Del Re A, et al. Sodium oxybate in maintaining alcohol abstinence in alcoholic patients with and without psychiatric comorbidity. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011;21(6):450–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.12.005>
 86. Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, et al. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9370):1677–85.
 87. Martinotti G, Di Nicola M, Di Giannantonio M, Janiri L. Aripiprazole in the treatment of patients with alcohol dependence: A double-blind, comparison trial vs. Naltrexone. *J Psychopharmacol*. 2009;23(2):123–9.
 88. Colombo G, Orrù A, Lai P, Cabras C, Maccioni P, Rubio M, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, as a promising

- pharmacotherapy for alcohol dependence: Preclinical evidence. *Mol Neurobiol.* 2007;36(1):102–12.
89. Lawford BR, Young RM, Rowell JA, Qualichefski J, Fletcher BH, Sydulko K, et al. Bromocriptine in the treatment of alcoholics with the D2dopamine receptor A1 allele. *Nat Med.* 1995;1(4):337–41.
90. Furieri FA N-PE. Gabapentin reduces alcohol consumption and craving: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Psychiatry.* 2007;68(11):691–700.
91. Kast RE. Bupropion : pharmacology and therapeutic applications. 2014;(October 2006).
92. Méndez M MM. Role of mu and delta opioid receptors in alcohol drinking behaviour. *Curr Drug Abus Rev.* 2008;1(2):239–52.
93. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 2005;162(8):1403–13.
94. Kashem Abul Mohammed , Šerý Omar , Pow V. David , Rowlands D. Benjamin RDC and BJV. Actions of Alcohol in Brain: Genetics, Metabolomics, GABA Receptors, Proteomics and Glutamate Transporter GLAST/EAAT1. *Curr Mol Pharmacol.* 2021;14(2):138–49.
95. Ilveskoski E, Kajander OA, Lehtimäki T, Kunnas T, Karhunen PJ, Heinälä P, et al. Association of neuropeptide Y polymorphism with the occurrence of type 1 and type 2 alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(10):1420–2.
96. Méplan C, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Tjønneland A, Vogel U, Hesketh J. Association between Polymorphisms in Glutathione Peroxidase and Selenoprotein P Genes, Glutathione Peroxidase Activity, HRT Use and Breast Cancer Risk. Coleman WB, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 10 [cited 2017 Mar 15];8(9):e73316. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073316>
97. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Gentile C, Livrea M a. Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF-κB-dependent release

- of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *Br J Nutr* [Internet]. 2014;111(03):415–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931157>http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114513002663
98. González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14660–71.
 99. Crews FT. Immune function genes, genetics, and the neurobiology of addiction. *Alcohol Res* [Internet]. 2012;34(3):355–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x>papers3://publication/doi/10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x
 100. Crews FT, Vetreno RP. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(9):1543–57.
 101. Crews FT, Lawrimore CJ, Walter TJ, Coleman LG. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. *Neuropharmacology*. 2017;122:56–73.
 102. He J and FTC. Increased MCP-1 and Microglia in Various Regions of the Human Alcoholic Brain. *Exp Neurol*. 2008;210(2):349–58.
 103. Dantzer KWK and R. Alcoholism and Inflammation: Neuroimmunology of Behavioral and Mood Disorders. *Brain Behav Immun*. 2011;25(01):S13–S20.
 104. Rajeshwara N, Achur, Willard M, Freeman and KEV. Circulating Cytokines as Biomarkers of Alcohol Abuse and Alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010;5(1):83–91.
 105. Kim YK, Lee BC, Ham BJ, Yang BH, Roh S, Choi J, et al. Increased transforming growth factor-beta1 in alcohol dependence. *J Korean Med Sci*. 2009;24(5):941–4.
 106. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Heal*. 2003;27(4):277–84.

107. Coleman LG, Zou J, Crews FT. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1–15.
108. Mayfield J, Ferguson L, Harris RA. Neuroimmune signaling: A key component of alcohol abuse. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(4):513–20.
109. UniProtKB. No Title [Internet]. UniProtKB - P37840 (SYUA_HUMAN). Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P37840>
110. Organización Mundial de la Salud. Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas. *Neurocienc del Consum y Depend Sust psicoactivas-resumen*. 2005;236–58.
111. Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci*. 2016;21(29):e-collection.
112. Janeczek P, Lewohl JM. The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism. *Neurochem Int* [Internet]. 2013;63(3):154–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.007>
113. Ziolkowska B, Gieryk A, Wawrzczak-Bargiela A, Krowka T, Kaminska D, Korkosz A, et al. α -Synuclein expression in the brain and blood during abstinence from chronic alcohol drinking in mice. *Neuropharmacology*. 2008;54(8):1239–46.
114. Caplan IF, Maguire-Zeiss KA. Toll-like receptor 2 signaling and current approaches for therapeutic modulation in synucleinopathies. *Front Pharmacol*. 2018;9(MAY):1–18.
115. Janeczek P, Mackay RK, Lea RA, Dodd PR, Lewohl JM. Reduced expression of α -synuclein in alcoholic brain : influence of SNCA -Rep1 genotype. *Addict Biol*. 2014;19(3):509–15.
116. Nunez YO, Mayfield RD. Understanding alcoholism through microRNA signatures in brains of human alcoholics. *Front Genet*. 2012;3(APR):1–13.
117. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:1–16.

118. Nguyen HN, Noss EH, Mizoguchi F, Huppertz C, Wei KS, Watts GFM, et al. Autocrine Loop Involving IL-6 Family Member LIF, LIF Receptor, and STAT4 Drives Sustained Fibroblast Production of Inflammatory Mediators. *Immunity*. 2017;46(2):220–32.
119. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The Many Faces of Interleukin-6: The Role of IL-6 in Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Int J Rheumatol*. 2011;1–6.
120. Mukamal KJ, Jenny NS, Tracy RP, Siscovick DS. Alcohol consumption, interleukin-6 and apolipoprotein E genotypes, and concentrations of interleukin-6 and serum amyloid P in older adults. *Am J Clin Nutr*. 2008;86(2):444–50.
121. Carnota JJG. El papel del factor de necrosis tumoral en la inflamación y el daño articular en la artritis reumatoide. *Rev Española Reumatol*. 2002;1-suplemen(1):2–4.
122. Kashem MA, Šerý O, Pow DV, Rowlands BD, Rae CD BV. Actions of Alcohol in Brain: Genetics, Metabolomics, GABA Receptors, Proteomics and Glutamate Transporter GLAST/EAAT1. *Curr Mol Pharmacol*. 2021;14(2):138–49.
123. Heberlein A, Käser M, Lichtinghagen R, Rhein M, Lenz B, Kornhuber J, et al. TNF- α and IL-6 serum levels: Neurobiological markers of alcohol consumption in alcohol-dependent patients? *Alcohol*. 2014;48(7):671–6.
124. Sprowl JA, Reed K, Armstrong SR, Lanner C, Guo B, Kalatskaya I, et al. Alterations in tumor necrosis factor signaling pathways are associated with cytotoxicity and resistance to taxanes: A study in isogenic resistant tumor cells. *Breast Cancer Res*. 2012;14(1):R2.
125. Fiers W. Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 1991;285(2):199–212.
126. Carrasco LO. CITOQUINAS : DE FIELES ALIADAS A TEMIBLES ENEMIGAS. *Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient*. 2011;24(1):75–90.
127. Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y. IL-1 Receptor Type 2 Suppresses

- Collagen-Induced Arthritis by Inhibiting IL-1 Signal on Macrophages. *J Immunol.* 2015;194:3156–68.
128. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A. INTERLEUKIN-1 GENE CLUSTER POLYMORPHISMS AND ALCOHOLISM IN SPANISH MEN. 2005;40(3):181–6.
129. Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: Relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2007;72(5):408–15.
130. Ciudad J, Laso FJ, Iglesias MC, Lo A, Miguel FS, Orfao A. Increased interleukin-12 serum levels in chronic alcoholism. 1998;1(17):771–7.
131. Solà CA. Interferones : tipos y acciones. 2006;29(Supl 2):125–8.
132. Davidson S, McCabe TM, Crotta S, Gad HH, Hessel EM, Beinke S, et al. IFN κ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment. 2016;8(9):1099–112.
133. Szabo, G., Catalano, D., Bellerose, G. and Mandrekar P. Interferon α and Alcohol Augment Nuclear Regulatory Factor- κ B Activation in HepG2 Cells, and Interferon α Increases Pro-Inflammatory Cytokine Production. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(1188–1197).
134. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829–37.
135. Steffen Stenger, Heike Thüring, Martin Röllinghoff, Pamela Manning CB. L-N⁶-(1-Iminoethyl)-lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-arginine in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1995;294(2–3):703–12.
136. Roger T, Ding X, Chanson A, Renner P. Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression.
137. Wang F, Huang X, Shen N, Leng L, Bucala R, Chen S, et al. A genetic role

- for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in adult-onset Still ' s disease. 2013;
138. Petralia M, Mazzon E, Mangano K, Fagone P, Di Marco R, Falzone L, et al. Transcriptomic analysis reveals moderate modulation of macrophage migration inhibitory factor superfamily genes in alcohol use disorders. *Exp Ther Med*. 2020;1755–62.
 139. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci*. 2005;118(20):4589–92.
 140. Edenberg HJ, Xuei X, Wetherill LF, Bierut L, Bucholz K, Dick DM, et al. Association of NFKB1, which encodes a subunit of the transcription factor NF- κ B, with alcohol dependence. *Hum Mol Genet*. 2008;17(7):963–70.
 141. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N. The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. *Front Immunol*. 2020;11(June):1–13.
 142. Li G, Liang X, Lotze MT. HMGB1: The central cytokine for all lymphoid cells. *Front Immunol*. 2013;4(MAR):1–9.
 143. Liu Y, Prasad R, Wilson SH. HMGB1: Roles in base excision repair and related function. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2010;1799(1–2):119–30.
 144. Coleman LG, Zou J, Qin L, Crews FT. HMGB1/IL-1 β complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism. *Brain Behav Immun*. 2018;72:61–77.
 145. laomin LIUX, Englin CAOF, Ianmin HUOJ, Uzhi SHIY, Insheng GONGB, Ingmei ZHY. Correlation Between Genetic Polymorphism of Cytokine Genes , Plasma Protein Levels and Bronchial Asthma in the Han People in Northern China. 2008;583–9.
 146. Campo-arias A, Villamil-vargas M, Herazo E. Confiabilidad y dimensionalidad del audit en estudiantes de medicina. *Psicol desde el Caribe*. 2013;30(1):21–35.
 147. Juan Manuel Ospina-Díaz, Fred Gustavo Manrique - Abril NEAR. Confiabilidad y dimensionalidad del Cuestionario para Identificación de

- Trastornos Debidos al Consumo de Alcohol (AUDIT) en estudiantes universitarios de Tunja (Colombia). *Rev Científica Salud Uninorte*. 2012;28(2):276–82.
148. Scoppetta O. mediante análisis de correspondencias múltiples. 2011;(October 2014).
149. Silla Stoel M, Rosón Hernández B. Evaluación del consumo de alcohol y diagnóstico de patrón de consumo. *Trastor Adict*. 2009;11(3):191–9.
150. Herrán OF, Ardila MF, Barba DM. Consumo problemático de alcohol en Bucaramanga, Colombia: Diseño y validación de una prueba. *Biomedica*. 2008;28(1):25–37.
151. Brown D. KNOWING YOUR LIMITS WITH ALCOHOL. *Addiction CC on SU and*, editor. 2019. 40 p.
152. Vidal-Taboada JM, Cucala M, Herrero SM, Lafuente A, Cobos A. Satisfaction survey with DNA cards method to collect genetic samples for pharmacogenetics studies. *BMC Med Genet*. 2006;7:1–9.
153. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
154. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecol Mol*. 2007;517–36.
155. Altschup SF, Gish, Warren1. Altschup SF, Gish W, Pennsylvania T PUBLAST 2Department of CSJMB 1990;3:403–10., Pennsylvania T, Park U. Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. *J Mol Bio*. 1990;3:403–10.
156. Koressaar T RM. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289–91.
157. IBM Corp. Released. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. NY: IBM Corp.; 2015.
158. Peakall R and SPE. GENALEX 6: genetic analysis in Exc. *Popul Genet*

- Softw Teach Res Mol Ecol Notes. 2006;(6):288-295.
159. (<https://www.snpstats.net/snpstats/start.htm>).
160. (<http://epistasis.org>).
161. Wong AK*, Krishnan A*, Yao V*, Tadych A TO. IMP 2.0: a multi-species functional genomics portal for integration, visualization and prediction of protein functions and networks. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:W128–33.
162. Gómez Moya J. El alcoholismo femenino, una verdad oculta. *Trastor Adict.* 2006;8(4):251–60.
163. Irati Fajó Roncal. Trabajo Fin de Grado Uso y abuso de sustancias psicoactivas en la adolescencia. 2020.
164. Giménez-García C, Ruiz-Palomino E, Gil-Juliá B, García-Nebot JE, Ballester-Arnal R. Alcohol y juventud ¿existen diferencias en consumo de hombres y mujeres según edad de inicio? *Int J Dev Educ Psychol Rev INFAD Psicol.* 2018;2(1):317.
165. Clínicas G, Basadas En La S, Científica E, Edición ^a, Pascual F, Guardia J, et al. Alcoholismo Alcoholismo Guías Clínicas SOCIDROGALCOHOL basadas en la EVIDENCIA CIENTÍFICA. Vol. 13. 2013. 5–1 p.
166. A RAJ. Aspectos genéticos de l alcoholismo Genetic aspects of alcoholism. 2003;5(3):213–22.
167. Pérez-Campo FM, Sañudo C, Krebsova R, Delgado-Calle J RJ. Estudio funcional de los polimorfismos del promotor del gen de la esclerostina. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2016;8(4):121–6.
168. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Mo and BLK. “ALFA: Allele Frequency Aggregator.” www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/. 2020.
169. Lee C, Huang CH. LASAGNA-search: An integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *Biotechniques.* 2013;54(3):141–53.

-
170. Raiber EA, Kranaster R, Lam E, Nikan M, Balasubramanian S. A non-canonical DNA structure is a binding motif for the transcription factor SP1 in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(4):1499–508.
 171. Kapelski P, Skibinska M, Maciukiewicz M, Wilkosc M, Frydecka D, Groszewska A, et al. Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL6R, IL10, IL10RA and TGFB1 in schizophrenia in Polish population. *Schizophr Res.* 2015;169(1–3):1–9.
 172. Foroud T, Wetherill LF, Liang T, Dick DM, Hesselbrock V, Kramer J, et al. Association of alcohol craving with α -synuclein (SNCA). *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(4):537–45.
 173. Al WET, Wilcox CE, Claus ED, Ph D, Blaine SK, S MMM. Genetic Variation in the Alpha Synuclein Gene (SNCA). 2008;
 174. Brighina L, Schneider NK, Lesnick TG, de Andrade M, Cunningham JM, Mrazek D, et al. α -Synuclein, alcohol use disorders, and Parkinson disease: A case-control study. *Park Relat Disord.* 2009;15(6):430–4.
 175. Barve S, Kirpich IA, McClain CJ. Tumor necrosis factor alpha-induced receptor 1 signaling in alcoholic liver disease: A gut reaction? *Hepatology.* 2015 Mar;61(3):754–6.
 176. Clarimon J, Gray RR, Williams LN, Enoch MA, Robin RW, Albaugh B, et al. Linkage disequilibrium and association analysis of α -synuclein and alcohol and drug dependence in two American Indian populations. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(4):546–54.
 177. Lin Z, Walther D, Yu XY, Li S, Drgon T, Uhl GR. SLC18A2 promoter haplotypes and identification of a novel protective factor against alcoholism. *Hum Mol Genet.* 2005;14(10):1393–404.
 178. Ray LA, Sehl M, Bujarski S, Hutchison K, Blaine S, Enoch MA. The CRHR1 gene, trauma exposure, and alcoholism risk: A test of G \times E effects. *Genes, Brain Behav.* 2013;12(4):361–9.

179. Enoch MA, Hodgkinson CA, Yuan Q, Albaugh B, Virkkunen M, Goldman D. GABRG1 and GABRA2 as independent predictors for alcoholism in two populations. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(5):1245–54.
180. Wang JC, Hinrichs AL, Bertelsen S, Stock H, Budde JP, Dick DM, et al. Functional variants in TAS2R38 and TAS2R16 influence alcohol consumption in high-risk families of African-American origin. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(2):209–15.
181. Belfer I, Hipp H, McKnight C, Evans C, Buzas B, Bollettino A, et al. Association of galanin haplotypes with alcoholism and anxiety in two ethnically distinct populations. *Mol Psychiatry*. 2006;11(3):301–11.
182. Levy DE DJJ. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):651–62.
183. Michel Goedert. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(1):45–9.
184. Sigma-Aldrich. Histopaque_ -1077.
185. KEVIN P. FOLEY, MARK W. LEONARD EJD. Quantitatio0n of RNA using the p01ymerase chain reaction. *Trends Genet*. 1993;9(11):380–5.
186. , نسخ صادقى، معصومه.ذ. كويى، زهروه , Roche Diagnostics GmbH, Bertrand D, Shaw J, Kalathiappan M, Ng AHQ, et al. How to use the LightCycler® 96 System Guides [Internet]. Vol. 7, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2019. 1–13 p. Available from: http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01130-19%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/s41385-018-0053-0%0Ahttp://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/130%0Ahttp://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01056-19%0Ahttps://lifescience.roche.com/documents/LightCycler96_M
187. Vargas Hernández JE, Rey Buitrago M. Frutas enteras y expresión génica inflamatoria: Un estudio piloto in vivo en humanos. *Rev Española Nutr Humana y Dietética*. 2020;24(1):4.
188. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative

- real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611–22.
189. Victor R. Preedy, Matthwe E. Reilly, Vinnod J. Patel PJR and TJP. Protein Metabolism in alcoholism: Effects on Specific Tissues and the Whole Body. *Nutrition.* 1999;15(7/8):604–8.
190. Fei SS. Integrating genetics and proteomics to study alcohol-drinking behavior. 2011;(April).
191. Bönsch D, Reulbach U, Bayerlein K, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S. Elevated Alpha Synuclein mRNA Levels Are Associated with Craving in Patients with Alcoholism. *BIOL PSYCHIATRY.* 2004;56:984–6.
192. Guillot CR, Fanning JR, Liang T, Leventhal AM, Berman ME. An-synuclein gene (SNCA) polymorphism moderates the association of PTSD symptomatology with hazardous alcohol use, but not with aggression-related measures. *J Anxiety Disord.* 2015;30:41–7.
193. Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem.* 2008;106(2):650–61.
194. Tarale P, Daiwile AP, Sivanesan S, Stöger R, Bafana A, Naoghare PK, et al. Manganese exposure: Linking down-regulation of miRNA-7 and miRNA-433 with α -synuclein overexpression and risk of idiopathic Parkinson's disease. *Toxicol Vit.* 2018;46:94–101.
195. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H. Effect of polymorphisms of IL-17A , -17F and MIF genes on CpG island hyper-methylation (CIHM) in the human gastric mucosa. 2009;563–9.
196. Bucala R. MIF, MIF Alleles, and Prospects for Therapeutic Intervention in Autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2014;33(Suppl 1):72–8.
197. Janeczek P, Brooker C, Dodd PR, Lewohl JM. Differential expression of α -synuclein splice variants in the brain of alcohol misusers : Influence of genotype. *Drug Alcohol Depend.* 2015;155:284–92.

198. Zhao X-J, Dong Q, Bindas J, , Jon D. Piganelli AM, Reiser J, Kolls and JK. TRIF and IRF-3 Binding to the TNF Promoter Results in Macrophage TNF Dysregulation and Steatosis Induced by Chronic Ethanol. *J Immunol.* 2013;181(5):3049–56.
199. Zhang Z, Cork J, Ye P, Lei D, Schwarzenberger PO, Summer WR, et al. Inhibition of TNF- α processing and TACE-mediated ectodomain shedding by ethanol the mechanism of acute EtOH-induced TNF- α sup-. 2000;
200. Natri H, Garcia AR, Buetow KH, Trumble BC, Wilson MA. The Pregnancy Pickle: Evolved Immune Compensation Due to Pregnancy Underlies Sex Differences in Human Diseases. *Trends Genet.* 2019;35(7):478–88.
201. Prescott CA. Sex differences in the genetic risk for alcoholism. *Alcohol Res Heal.* 2002;26(4):264–73.
202. Weijers HG, Wiesbeck GA, Wodarz N, Keller H, Michel T, Böning J. Gender and personality in alcoholism. *Arch Womens Ment Health.* 2003;6(4):245–52.
203. Shi X, Li J, Zhao C, Lv S, Xu G. Methylation analysis of hMLH1 gene promoter by a bisulfite-sensitive single-strand conformation polymorphism-capillary electrophoresis method. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(8):815–20.
204. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821–6.
205. Boyd VL, Moody KI, Karger AE, Livak KJ, Zon G, Burns JW. Methylation-dependent fragment separation: Direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulfite-converted genomic DNA. *Anal Biochem.* 2006;354(2):266–73.
206. Nakao Lm. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene.* 2001;278(1–2):25–31.
207. Sarah L. Hagerty, L. Cinnamon Bidwell NH and KEH. HHS Public Access. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(8):1633–40.
208. C Liu, RE Marioni, ÅK Hedman, L Pfeiffer, P-C Tsai, LM Reynolds, AC Just,

- Q Duan, CG Boer, T Tanaka, CE Elks, S Aslibekyan, JA Brody, B Kühnel, C Herder, LM Almlie, D Zhi, Y Wang, T Huan, CY MM Mendelson, R Joehanes, L Liang, S-A Love, W Guan, S Shah, AF McRae, A Kretschmer HP, K Strauch, A Peters, PM Visscher, NR Wray, X Guo, KL Wiggins, AK Smith, EB Binder, KJ Ressler, MI, DM Absher, D Hernandez, L Ferrucci, S Bandinelli, K Lohman, J Ding, L Trevisi, S Gustafsson, JH Sandling, L Stolck, AG Uitterlinden, I Yet, JE Castillo-Fernandez, TD Spector, JD Schwartz, P Vokonas, L Lind, Y Li, MF, DK Arnett, NJ Wareham, N Sotoodehnia, KK Ong, JBJ van Meurs, KN Conneely, AA Baccarelli, IJ Deary, JT Bel, KE North, Y Liu, M Waldenberger, SJ London, EI and DL. A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol Psychiatry*. 2016;00(November):1–12.
209. Hillemecher T, Weinland C, Lenz B et al. DNA methylation of the LEP gene is associated with craving during alcohol withdrawal. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;51:371–7.
210. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*. 2011;6(7):828–37.
211. Szabo G, Petrasek J, Bala S. Innate immunity and alcoholic liver disease. *Dig Dis*. 2012;30(SUPPL. 1):55–60.
212. Zhu ZZ, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, et al. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: A combined analysis. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):126–39.
213. Rosen AD, Robertson KD, Hlady RA, Muench C, Lee J, Philibert R, et al. DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1).
214. Xu H, Wang F, Kranzler HR, Gelernter J, Zhang H. Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes. *Sci Rep*. 2017;7(February):1–10.

215. Bönsch, Dominikus; Lenz, Bernd; Kornhuber, Johannes; Bleich S. DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism. *Neuroreport*. 2005;16(2):167–70.
216. Fiszer R, Frieling H. Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. 2006;(October).
217. Jowaed A, Schmitt I, Kaut O, Wu U. Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson ' s Disease Patients ' Brains. 2010;30(18):6355–9.
218. G S. The sp-family of transcriptional factors. *Gene*. 1999;238(2):291–300.
219. Steffen Brenner, Christophe Wersinger TG. Transcriptional regulation of the α -synuclein gene in human brain tissue. *Neurosci Lett*. 2015;599:140–5.
220. Kantor B, Tagliafierro L, Gu J, Zamora ME, Ilich E, Grenier C, et al. Downregulation of SNCA Expression by Targeted Editing of DNA Methylation: A Potential Strategy for Precision Therapy in PD. *Mol Ther*. 2018;26(11):2638–49.
221. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang I, Desai P, et al. Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus *. 2006;281(23):15763–73.
222. Chaudhuri A, Chant J. Protein-interaction mapping in search of effective drug targets. *BioEssays*. 2005;27(9):958–69.
223. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. Vol. 20, *Molecules*. 2015. 13384–13421 p.
224. Zhihong Ai, Juan Wang, Yanli Xu YT. Bioinformatics analysis reveals potencial candidate drugs for cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(5):1052-1058.
225. Volkamer A, Kuhn D, Rippmann F, Rarey M. Dogsitescorer: A web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics*. 2012;28(15):2074–5.

-
226. Jesus FDS, Souza JB De. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PROMETEDORA DIANA. *Rev CIENTÍFICA Multidiscip NÚCLEO DO CONHECIMENTO*. 2020;9:99–132.
227. Webb B, Sali A, Francisco S. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;54(ii):5.6.1–5.6.37.
228. RAMACHANDRAN GN, RAMAKRISHNAN C S V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 1963;7:95–9.
229. Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J Mol Biol*. 2018;430(15):2237–43.
230. Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5191–6.
231. Vyas N, Companioni RAC, Walfish A, Baum J, Alkhawam H, Tiba M. Association between vitamin D and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2015;110:S1034. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L72132558%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/ajg.2015.281>
232. Schrödinger, L., & DeLano W. PyMOL. 2020. p. <http://www.pymol.org/pymol>.
233. Lipinski CA. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;101:34–41.
234. Orita M, Yamamoto S, Katayama N, Aoki M, Takayama K, Yamagiwa Y, Seki N, Suzuki H, Kurihara H, Sakashita H, Takeuchi M, Fujita S, Yamada T TA. Coumarin and chromen-4-one analogues as tautomerase inhibitors of macrophage migration inhibitory factor: discovery and X-ray crystallography. *J Med Chem*. 2001;44(4):540–7.
235. Bell RL, Lopez MF, Cui C, Egli M, Johnson KW, Franklin KM, et al. Ibudilast

- reduces alcohol drinking in multiple animal models of alcohol dependence. *Addict Biol.* 2015;20(1):38–42.
236. Cho Y, Crichlow G V., Vermeire JJ, Leng L, Du X, Hodsdon ME, et al. Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11313–8.
237. Grodin EN, Bujarski S, Towns B, Burnette E, Nieto S, Lim A, et al. Ibudilast, a neuroimmune modulator, reduces heavy drinking and alcohol cue-elicited neural activation: a randomized trial. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):1–8.
238. Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M, et al. Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2013;48(2):79–88.
239. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Review: Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(1):115–28.
240. Corpas R, Griñán-Ferré C, Rodríguez-Farré E, Pallàs M, Sanfeliu C. Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement. *Mol Neurobiol.* 2019;56(2):1502–16.
241. Liu X, Vigorito M, Huang W, Khan MAS, Chang SL. The Impact of Alcohol-Induced Dysbiosis on Diseases and Disorders of the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021;(0123456789).
242. Zhang LF, Yu XL, Ji M, Liu SY, Wu XL, Wang YJ, et al. Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T α -synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Food Funct.* 2018;9(12):6414–26.