

Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes *CYP2A6**12 y rs16969968 de *CHRNA5* y su asociación con el hábito de fumar y el índice de masa corporal (IMC) en sujetos jóvenes del noreste de México

GISSELA BORREGO-SOTO^{1,2,a}, ANTONIO COSTILLA-ESQUIVEL^{2,e},
GERARDO RAYMUNDO PADILLA-RIVAS^{1,b},
PAULINA JANETH CÁZARES-SAMANIEGO^{1,c},
RODOLFO POSADAS-VALAY³,
JOSÉ GERARDO VELASCO-CASTAÑÓN^{2,e},
ROBERTO MERCADO-LONGORIA⁴, ROCÍO ORTIZ-LÓPEZ^{1,2,d},
AUGUSTO ROJAS-MARTÍNEZ^{1,2,f}

Association between genotype and allele frequencies of *CYP2A6**12 and rs16969968 in *CHRNA5* variants with smoking and body mass index in young subjects from Northeast Mexico

Background: Several studies have reported that variants rs16969968 G>A of the *CHRNA5* gene and *CYP2A6**12 of the *CYP2A6* gene are associated with smoking and smoking refusal, respectively. In addition, some studies report that a higher cigarette consumption is associated with low body mass index (BMI). **Aim:** To analyze the allele and genotypic frequencies of these variants and their impact on smoking and BMI. **Material and Methods:** A blood sample was obtained and a survey about smoking habits was answered by 319 university students aged 18 to 35 years (127 women, 171 smokers), living in Northeastern Mexico. Genetic variants were studied by polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism and their frequencies were associated with smoking and BMI. **Results:** No associations were found between the analyzed variants and smoking in the study groups. However, there was an association among non-smoking subjects between the A allele of rs16969968 and high a BMI ($p < 0.01$). **Conclusions:** This last variant may be involved in food-addiction disorders.

(Rev Med Chile 2015; 143: 1377-1385)

Key words: Body mass index; Genetic variation; Nicotine; Smoking.

El tabaquismo es la causa prevenible de morbilidad y mortalidad más importante en el mundo y se relaciona con un gran número de problemas de salud, entre ellos enfermedades

respiratorias, cardiovasculares y cáncer¹. El tabaco causa alrededor de 6 millones de muertes al año y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) esta cifra podría alcanzar los 8 millones para el año

¹Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

²Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

³Centro Universitario de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

⁴Servicio de Neumología, Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

^aQuímico-Biólogo. MSc.

^bMédico veterinario. PhD.

^cLicenciada en Biotecnología.

^dQuímico Farmacobiólogo.

Doctora en Ciencias.

^eMSc.

^fMédico Cirujano, Maestro en Genética Humana. Doctor en Ciencias.

Apoyo financiero: Fondos CONACyT S0008-2014-1 "Estudios Toxicogenómicos en Sujetos Jóvenes de la Nitrosamina NNAL Derivada de la Nicotina".

Recibido el 7 de enero de 2015, aceptado el 13 de agosto de 2015.

Correspondencia a:

Dr. Augusto Rojas-Martínez

Av. Francisco I. Madero y

Dr. Eduardo Aguirre

Pequeño s/n.

Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México CP. 64460.

Teléfono: +52 (81) 83485287,

Fax: +52 (81) 83485287,

arojasmtz@gmail.com

augusto.rojasm@uanl.mx

2030. La mayoría de los consumidores de tabaco adquieren este hábito antes de cumplir los 20 años de edad (<http://www.who.int/es/>).

La nicotina es el agente adictivo del tabaco². La nicotina es metabolizada principalmente a cotinina por el citocromo *CYP2A6* cuyo locus se ubica en el cromosoma 19. El gen *CYP2A6* es altamente polimórfico y las variantes de *CYP2A6* pueden causar diferencias individuales en el metabolismo³⁻⁵. Deleciones del gen *CYP2A6*, o parte de este, causan reducción de la actividad enzimática y ralentizan el metabolismo de la nicotina. Los sujetos portadores de estas deleciones son menos propensos a fumar y menos adictos a la nicotina en comparación con los sujetos con la enzima de tipo silvestre⁶. *CYP2A6* también está involucrado en el metabolismo de algunas nitrosaminas aromáticas, como el procarcinógeno NNK 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), resultante de la combustión de la nicotina, específico del humo del cigarrillo y clasificado como carcinógeno tipo I por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC)^{7,8}. *CYP2A6**12 es una variante resultante de una translocación entre los genes *CYP2A6* y *CYP2A7* que genera un híbrido *CYP2A6/CYP2A7* formado por los exones 1-2 del gen *CYP2A7* y los exones 3-9 del gen *CYP2A6*; esto causa la pérdida de 10 aminoácidos y la actividad reducida de *CYP2A6*⁹.

Una variante que ha sido asociada a la adicción a la nicotina es el cambio de G>A en la posición 1,354 del gen *CHRNA5* (rs16969968). El locus *CHRNA5* está ubicado en el cromosoma 15 y codifica para la subunidad $\alpha 5$ del receptor nicotínico de la acetilcolina¹⁰⁻¹². Este es un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) no sinónimo que causa un cambio de aminoácido de aspartato a asparagina (D398N) y tiene como consecuencia la desensibilización del receptor por la nicotina¹³. Estudios de asociación amplia del genoma (GWAS) han mostrado asociación del SNP rs16969968 con la dependencia a la nicotina, en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y con cáncer de pulmón¹⁴⁻¹⁶. Estudios epidemiológicos han relacionado el hábito de fumar a la disminución del índice de masa corporal (IMC)¹⁷, debido a que la nicotina disminuye el apetito y aumenta el metabolismo corporal¹⁸. Asimismo, variantes de los loci *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* ubicados en 15q25 han sido asociados con IMC reducido en fumadores¹⁷.

Es importante analizar las frecuencias de las variantes genéticas relacionadas con el consumo de tabaco y su comportamiento para idear nuevas estrategias preventivas y terapéuticas que ayuden a la disminución o eliminación del hábito de fumar y estudiar su contribución a la obesidad. El objetivo de este estudio fue investigar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes *CYP2A6**12 y rs16969968 del gen *CHRNA5* en una población de jóvenes fumadores y no fumadores del noreste de México y su asociación con el consumo de cigarrillos e IMC.

Materiales y Métodos

Diseño

Se realizó un estudio transversal de casos y controles para analizar la asociación genética de las variantes rs16969968 y *CYP2A6**12 con tabaquismo e IMC en jóvenes fumadores (casos) y no fumadores (controles) de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, México.

Participantes y colección de datos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número B112-005 y se respetaron las normas éticas de la declaración de Helsinki. Se reclutaron 319 voluntarios, estudiantes universitarios de 18 a 35 años de edad, entre mayo de 2013 y mayo de 2014. Los participantes firmaron un consentimiento informado, contestaron una encuesta acerca de la exposición al humo del cigarrillo, características socio-demográficas y donaron aproximadamente 10 mL de sangre venosa anticoagulada con EDTA.

Genotipificación

El ADN fue aislado a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando la técnica de TSNT (*buffer* de lisis: 2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; seguido por extracción fenol-cloroformo. Ver Anexo 1)¹⁹ y se cuantificó utilizando Nanodrop 2000 Thermo Scientific (Waltham, MA). Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Mastercycler Ep gradient, Eppendorf (Barkhausenweg, Alemania) y se utilizaron reactivos de Promega (Madison, WI), y Sigma (St. Louis, MO).

CYP2A6*12

La genotipificación de *CYP2A6*12* se desarrolló mediante el método descrito por Oscarson y cols.⁹, con pequeñas variaciones. El proceso se realizó en dos pasos (PCR1 y PCR2). En la PCR1 se amplificó una región común de *CYP2A6*1* (tipo silvestre) y *CYP1A6*12* (variante) de 2,3 kb utilizando 100 ng de ADN en cada reacción. La mezcla de reacción fue realizada con GoTaq Green Master Mix (Promega), 2,5 μ M de los iniciadores 2A-F (5'-GCACCCCTCCTGAGGTACCAC-3') y 2A6ex3R1 (5'-GTCCCCTGCTCACCGCCA-3') en un volumen final de 10 μ L. El programa de PCR inició con desnaturalización a 95°C por 1 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 20 segundos, extensión a 72°C por un minuto y extensión final a 72°C por 7 min. La mezcla de reacción para la PCR2, la cual es alelo específica, se realizó con 1 μ L de una dilución 1:100 del producto de la PCR1, GoTaq Green Master Mix (Promega), 50 μ M de iniciadores sentido (2A6ex1: 5'-AACACAGAGCAGATGTACA-3' o 2A7ex1: 5'-AACACAGAGCACATATGTG-3') y 50 μ M de iniciadores antisentido (5'-CGTCCCCGTTGCTGAATA-3') en un volumen final de 10 μ L. El programa de PCR inició con una desnaturalización a 95°C por 1 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 20 segundos, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en geles de agarosa al 1.2%

La PCR1 identifica *CYP2A6*1* con un amplicón de 2,3 kb, mientras que la PCR2 identifica el alelo híbrido *CYP2A6/CYP2A7* con el iniciador 2A7ex1 y el alelo silvestre con el iniciador 2A6ex1, ambos generan un amplicón de aproximadamente 1,5 kb.

CHRNA5 (rs16969968)

Se utilizó PCR para amplificar el ADN seguido por una reacción de restricción con la enzima *TaqI* para identificar la mutación siguiendo el método de Bierut y cols.¹⁹. Se utilizaron 100 ng de ADN, GoTaq Green Master Mix de Promega, 50 μ M de los primers *CHRNA5-F* (5'-CGCCTTTGGTCCGCAAGATA-3') y *CHRNA5-R* (5'-TGCTGATGGGGAAGTGGAG-3') en un volumen final de 10 μ L para amplificar un fragmento de 435 pb. El programa de PCR inició con desnaturalización a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnatu-

ralización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y posteriormente una extensión final a 72°C por 10 min. 5 μ L del producto de PCR se digirieron con la enzima *TaqI* durante toda la noche a 55°C. Los productos de PCR y los fragmentos de digestión fueron observados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El cambio 1354G>A elimina un sitio de restricción para la enzima *TaqI* y genera un solo fragmento de 435 pb (homocigoto AA), el alelo silvestre G está en un sitio de corte que genera 2 fragmentos de 290 pb y 145 pb (homocigotos GG), los heterocigotos AG generan 3 fragmentos de 435 pb, 290 pb y 145 pb.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis del patrón de datos faltantes completamente aleatorio, se omitieron en cada análisis los valores faltantes en las variables comparadas (SPSS 19). Se determinaron las variables demográficas y somatométricas y se les comparó entre los grupos fumadores vs no fumadores, y mujeres vs hombres mediante pruebas t para variables continuas o pruebas de Welch y pruebas de cociente de verosimilitudes para variables categóricas. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado (χ^2) para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), las asociaciones entre genotipos, fenotipos y el IMC, éste último agrupado de acuerdo a los estándares de la OMS en bajo a normal (≤ 25 kg/m²), sobrepeso ($> 25 - < 30$ kg/m²) y obesidad (≥ 30 kg/m²). Se tomó una $p < 0,05$ como significativa. Se ajustó un modelo logístico ordinal con IMC agrupado como dependiente y género, tabaquismo y alelos *CHRNA5* como independientes (JMP-SW 12).

Resultados***Descripción de la población de estudio***

Trescientos diecinueve sujetos jóvenes accedieron a participar voluntariamente en el estudio, 148 no fumadores y 171 fumadores. La proporción de mujeres (127) y hombres (192) y la edad en años fueron semejantes entre ambos grupos; la estatura, el peso, el IMC, y el IMC agrupado (mayor sobrepeso y obesidad en fumadores) resultaron estadísticamente diferentes, pero al ajustarse el efecto de género en modelos de regresión el tabaquismo careció de significancia (Tabla 1).

Frecuencias alélicas y genotípicas

Todos los individuos fueron genotipificados para las variantes rs16969968 de *CHRNA5* y *CYP2A6**12. Las frecuencias genotípicas de rs16969968 fueron: 0,66 homocigoto silvestres (GG), 0,31 heterocigotos (AG) y 0,03 homocigotos mutantes (AA). Las frecuencias genotípicas de

*CYP2A6**12 fueron: 0,93 homocigotos silvestres, 0,07 heterocigotos y 0,0 homocigotos mutantes. Las frecuencias del alelo menor (FAM) de rs16969968 y *CYP2A6**12 fueron 0,185 y 0,035, respectivamente. Las distribuciones genotípicas de estos dos marcadores fueron consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 2).

Tabla 1. Características demográficas, somatométricas, tabaquismo y de consumo de alcohol de la muestra en estudio por género

Variable	Todos	Mujeres	Hombres	p valor	
Sujetos (n)	319	127	192		
No fumadores	148	66	82		
Fumadores	171	61	110	0,10*	
Edad (años)	312 observaciones	20,4 (2,5) [‡]	20,2 (0,2) ^{##}	20,5 (0,2) ^{##}	0,25**
No fumadores	20,2 (0,2) ^{##}	20,1 (0,3) ^{##}	20,3 (0,3) ^{##}	0,31****	
Fumadores	20,5 (0,2) ^{##}	20,3 (0,3) ^{##}	20,7 (0,3) ^{##}		
Estatura (mts)	309 observaciones	1,70 (0,1) [‡]	1,61 (0,01) ^{##}	1,76 (0,01) ^{##}	< 0,00***
No fumadores	1,68 (0,01) ^{##}	1,60 (0,01) ^{##}	1,75 (0,01) ^{##}	< 0,00****	
Fumadores	1,71 (0,01) ^{##}	1,62 (0,01) ^{##}	1,76 (0,01) ^{##}		
Peso (kg)	307 observaciones	71,0 (17,5) [‡]	61,7 (1,4) ^{##}	77,0 (1,1) ^{##}	< 0,00***
No fumadores	68,0 (1,4) ^{##}	59,1 (2,2) ^{##}	75,0 (1,63) ^{##}	< 0,00****	
Fumadores	73,4 (1,4) ^{##}	64,5 (2,2) ^{##}	78,5 (1,4) ^{##}		
IMC	301 observaciones	24,5 (4,8) [‡]	23,8 (0,5) ^{##}	25,1 (0,4) ^{##}	0,01***
No fumadores	24,1 (0,4) ^{##}	23,2 (0,6) ^{##}	25,0 (0,6) ^{##}	0,05****	
Fumadores	25,0 (0,4) ^{##}	25,0 (0,7) ^{##}	25,2 (0,5) ^{##}		
IMC agrupado ¹	301 observaciones				
Todos	Bajo a normal	192 (64%)	90 (76%)	102 (56%)	
	Sobrepeso	77 (26%)	16 (14%)	61 (33%)	
	Obesidad	32 (11%)	12 (10%)	20 (11%)	< 0,00*
No fumadores	Bajo a normal	99 (71%)	51 (84%)	48 (61%)	< 0,01****
	Sobrepeso	30 (21%)	6 (10%)	37 (36%)	
	Obesidad	11 (8%)	4 (7%)	7 (9%)	
Fumadores	Bajo a normal	93 (58%)	39 (68%)	54 (52%)	
	Sobrepeso	47 (29%)	10 (18%)	37 (36%)	
	Obesidad	21 (13%)	8 (14%)	13 (13%)	

*Cociente de verosimilitudes. **Prueba t /ANOVA de un factor. ***Prueba de Welch (variables heteroscedásticas). ****Regresión con género y tabaquismo como independientes. *****Regresión logística ordinal con género y tabaquismo como independientes. †Media (Desviación estándar). ‡Media (Error estándar de la media). ††Media (Intervalo de confianza al 95%).¹Los porcentajes fueron redondeados por lo que no en todos los casos suman 100%.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas para variantes de rs16969968 de *CHRNA5* y *CYP2A612**

Polimorfismos (silvestre/variante)	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia homocigotos S	Frecuencia heterocigotos	Frecuencia homocigotos M	FAM*	EHW (P)
<i>CHRNA5</i> rs16969968 (G/A)	0,815	0,185	0,66	0,31	0,03	0,185	0,86
<i>CYP2A6</i> *12	0,965	0,035	0,93	0,07	0,0	0,035	0,53

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg. Homocigotos S: homocigotos silvestres; Homocigotos M: homocigotos mutados. *FAM: Frecuencia del alelo menor.

Análisis de asociación de la distribución alélica y genotípica con el hábito de fumar

Ninguna de las variantes estudiadas mostró asociaciones con el hábito de fumar (Tabla 3), ni con el número de cigarrillos consumidos por día

en fumadores (datos no mostrados). Cuando se realizaron las comparaciones de las variantes de *CHRNA5* y *CYP2A6* entre fumadores y no fumadores calculadas para cada género, tampoco se observan diferencias (*CHRNA5* mujeres: $p = 0,94$,

Tabla 3. Asociación entre variantes de rs16969968 de *CHRNA5* y *CYP2A612 con tabaquismo**

		Distribución alélica		Distribución genotípica		
		G	A	Homocigoto silvestre (GG)	Heterocigoto (GA)	Homocigoto mutado (AA)
<i>CHRNA5</i> (rs16969968)						
Todos		522 (82%) ¹	116 (18%)	212 (66%)	98 (31%)	9 (3%)
	Mujeres n = 129	221 (86%)	37 (14%)	96 (74%)	29 (23%)	4 (3%)
	Hombres n = 190	301 (79%)	79 (21%)	116 (61%)	69 (36%)	5 (3%)
		$p = 0,04^*$; OR = 1,44**		$p = 0,03^*$; $p < 0,00$; $p < 0,00$; $p = 0,06$; $p < 0,00$; $p = 0,03^{***}$		
Mujeres	No fumadoras n = 67	115 (85,8%)	19 (14,2%)	49 (73,1%)	17 (25,4%)	1 (1,5%)
	Fumadoras n = 62	106 (85,5%)	18 (14,5%)	47 (75,8%)	12 (19,3%)	3 (4,8%)
		$p = 0,94$		$p = 0,42$		
Hombres	No fumadores n = 81	134 (82,7%)	28 (17,3%)	56 (69,1%)	22 (27,2%)	3 (3,7%)
	Fumadores n = 109	167 (76,6%)	51 (23,4%)	60 (55%)	47 (43,1%)	2 (1,8%)
		$p = 0,15$		$p = 0,07$		
<i>CYP2A6</i>*12						
		Distribución alélica		Distribución genotípica		
		Silvestre	Híbrido	Homocigoto silvestre (Silvestre/Silvestre)	Heterocigoto (Silvestre/Híbrido)	Homocigoto mutado (Híbrido/Híbrido)
Todos		591 (97%)	21 (0,3%)	285 (93%)	21 (7%)	0 (0%)
	Mujeres n = 123	223 (95%)	13 (5%)	110 (89%)	13 (11%)	0 (0%)
	Hombres n = 183	358 (98%)	8 (2%)	175 (96%)	8 (4%)	0 (0%)
		$p = 0,03^*$; OR = 2,5****		$p = 0,04^*$; $p < 0,00$; $p < 0,00$; $p = 0,06$; $p < 0,00$; $p = 0,03$		
Mujeres	No fumadoras n = 62	120 (96,7%)	4 (3,2%)	58 (93,5%)	4 (6,4%)	0 (0%)
	Fumadoras n = 61	113 (92,6%)	9 (7,4%)	52 (85,2%)	9 (14,7%)	0 (0%)
		$p = 0,14$		$p = 0,14$		
Hombres	No fumadores n = 76	148 (97,4%)	4 (2,6%)	72 (94,7%)	4 (5,3%)	0 (0%)
	Fumadores n = 107	210 (98,1%)	4 (1,89%)	103 (96,3%)	4 (3,7%)	0 (0%)
		$p = 0,62$		$p = 0,62$		

¹Todos los porcentajes son por renglón. *p-valor de cociente de verosimilitudes para diferencias por género. **p (A|Hombre)/p (A|Mujer). ***p-valores de modelo de regresión ordinal con IMC agrupado como dependiente, los de los parámetros individuales derivados de pruebas de Wald para los efectos: *modelo completo*, *CHRNA5*, *CYP2A6**12, *género*, *tabaquismo*. ****p (Híbrido|Mujer)/p (Híbrido|Hombre). El análisis de *CYP2A6**12 sólo se realizó en 306 sujetos en los que se logró la amplificación del segmento.

Tabla 4. Asociación entre IMC y distribución genotípica de rs16969968 de *CHRNA5* en fumadores y no fumadores

<i>CHRNA5</i> (rs16969968)								
IMC	n	Distribución alélica			Distribución genotípica			
		G	A	p	GG	AG	AA	p
No fumadores	130							
Media kg/m ²	24,2							
Rango kg/m ²	17,1-55,3							
≤ 25		172	27	0,03*	69	22	1	
> 25 - < 30		50	9	0,03**	20	7	1	0,01*
≥ 30		15	7	< 0,00***	5	3	2	< 0,00**
Fumadores	153							
Media (kg/m ²)	23,9							
Rango (kg/m ²)	15,6-31,1							
≤ 25		165	347		60	27	0	
> 25 - < 30		72	20		26	18	1	
≥ 30		31	13		12	7	2	

*p-valor de prueba de cociente de verosimilitudes. **p-valor de prueba de CMH para asociación general de categorías. ***p-valor de prueba de tendencia de Cochran Armitage.

CHRNA5 varones: $p = 0,15$. *CYP2A6* mujeres: $p = 0,14$, *CYP2D6* varones: $p = 0,62$). Sin embargo, sí se observaron diferencias entre los géneros y las variantes.

Asociación de los genotipos con el IMC

Tratado como una variable continua, no se encontraron diferencias significativas entre el IMC de fumadores y no fumadores ($p = 0,19$). Al incluir como variable dependiente el IMC agrupado en las categorías propuestas por la OMS (bajo a normal, sobrepeso y obesidad) género, *CHRNA5* y tabaquismo como independientes, se obtuvieron significancias de la prueba de χ^2 bajo tasa de falsos descubrimientos (FDR) para género masculino ($p = 0,01$), genotipo AA de *CHRNA5* ($p = 0,02$), y no así para tabaquismo, estos resultados tienen un carácter exploratorio dada la baja prevalencia del genotipo AA. No se encontraron diferencias entre los genotipos de *CYP2A6**12 y el IMC en fumadores y no fumadores. Asimismo, no se observaron diferencias alélicas entre las variantes rs16969968 y *CYP2A6**12 y el IMC (Tabla 4).

Discusión y conclusión

En el presente estudio se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes

rs16969968 de *CHRNA5* y *CYP2A6**12 y la asociación con el hábito de fumar e IMC. El alelo A de la variante rs16969968, se encuentra relacionado con el hábito de fumar, la adicción a la nicotina, EPOC y cáncer de pulmón²⁰⁻²³, mientras que el polimorfismo *CYP2A6**12 se ha relacionado con un menor consumo de cigarrillos y mayores probabilidades de dejar de fumar; sin embargo se asocia con un riesgo aumentado a desarrollar cáncer de pulmón^{3,5}. En este estudio no se encontró asociación de la variante rs16969968 de *CHRNA5* y *CYP2A6**12 con el hábito de fumar ni con la cantidad de cigarrillos consumidos por día.

Las frecuencias alélicas de *CYP2A6**12 y del alelo A de rs16969968 de *CHRNA5* fueron 0,035 y 0,185, respectivamente. La frecuencia de *CYP2A6**12 resultó más alta que la encontrada en los europeos y japoneses (0,02 y 0,008 respectivamente)^{5,9}. Las frecuencias del alelo A de la variante rs16969968 fueron bajas en comparación con europeos, pero altas en comparación con las poblaciones afro-americanas y de Asia oriental (0,42, 0,07 y $< 0,05$, respectivamente)²⁴⁻²⁶ (<http://www.hapmap.org>). Las frecuencias de las variantes estudiadas fueron similares en fumadores y no fumadores ($p = 0,31$).

La nicotina es considerada el principal supresor del apetito y control del peso corporal del cigarrillo²⁷. Mineur y cols. demostraron que la nicotina

disminuye la ingesta de alimentos y el IMC en modelos animales e identificaron mecanismos moleculares y sinápticos involucrados en la disminución de la ingesta de alimentos inducida por la nicotina²⁸. En este estudio no se encontraron diferencias significativas en el IMC entre fumadores y no fumadores y se observó un mayor porcentaje de sujetos con obesidad en fumadores (12%) en comparación con no fumadores (7,5%). Sin embargo, sí se encontraron diferencias entre el IMC en sujetos no fumadores y los genotipos de *CHRNA5*. Algunas variantes genéticas de locus *CHRNA5-A3-B4* se han asociado con el IMC. En este estudio el alelo A de la variante rs16969968 de *CHRNA5* se asoció significativamente con el IMC de manera exclusiva en los no fumadores, coincidiendo con lo reportado en estudios previos por Taylor y cols²⁹. Esto parece indicar que el alelo A de la variante rs16969968 puede tener un papel importante en la modulación del IMC, pero este efecto es independiente del hábito de fumar. Por otro lado, el alelo A de la variante rs16969968 de *CHRNA5* se ha identificado como un factor protector para la dependencia a la cocaína³⁰ y los niveles elevados de ARNm de *CHRNA5* se han relacionado con la dependencia al alcohol³¹. Es importante investigar si este polimorfismo tiene un papel en la modulación de la ingesta de alimentos a través de la activación del sistema de recompensa cerebral. Esto podría apoyar la hipótesis de la adicción a la comida, que sugiere que los alimentos apetecibles como los alimentos altos en grasas o muy dulces pueden ser “adictivos”, de una manera similar a la que se presenta en el abuso de las drogas^{32,33}. Por lo tanto, son necesarios

nuevos estudios para identificar los mecanismos involucrados en este tipo de adicción.

Es relevante tomar en cuenta que este estudio se realizó con un número relativamente bajo de muestras (n = 306) en comparación con otros estudios. En el estudio de Saccone y cols. se analizaron 2.062 sujetos europeos-americanos, observándose una alta frecuencia de la variante rs16969968 de *CHRNA5* (0,650) la cual estuvo asociada a la dependencia a la nicotina¹⁰. Sin embargo, en el estudio de Zhu y cols., realizado con 400 sujetos de Alaska, se observó una baja frecuencia de la misma variante (0,06 en fumadores) y no se encontró asociación con el consumo de nicotina³⁴. Por lo tanto, la frecuencia de la variante en las distintas poblaciones y el número de muestra pueden ser factores importantes que afectarían a los estudios de asociación. Es importante mencionar también que la encuesta no inquirió datos específicos para analizar hábitos alimentarios; adicionalmente, no se empleó un marcador directo del tabaquismo, como la medición de cotinina plasmática.

En conclusión, se encontraron diferencias entre el alelo A y el genotipo AA de rs16969968 y el IMC en los no fumadores, pero no se encontraron diferencias de las variantes rs16969968 y *CYP2A6*12* entre fumadores y no fumadores.

Agradecimientos. Los autores agradecen a los voluntarios participantes y a las autoridades de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su colaboración para la realización de este trabajo. Este proyecto es financiado por Fondo CONACyT S0008-2014-1.

Anexo 1

Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica por la técnica de TSNT (2% Triton, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

Fundamento

En la técnica de extracción de TSNT, el primer paso consiste en lisar las células de sangre periférica por la acción desnaturante de los detergentes SDS y Tritón X-100. Las proteínas desnaturadas son extraídas con fenol y Sevag, al centrifugar forman una palca sólida en la interfase, entre la fase acuosa y la orgánica. La parte superior corresponde a la fase acuosa, en esta se encuentra el ADN, el cual se precipita agregando etanol. El ADN obtenido se lava con etanol al 70% para eliminar sales, se seca y se disuelve en una solución amortiguadora de Tris-EDTA (TE).

Material y equipo

- Tubos Eppendorf de 2mL
- Puntillas y micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L
- Microcentrífuga

Reactivos

- Buffer de lisis TSNT (2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))
- Fenol saturado con Tris-HCl pH = 8.0
- Sevag (Cloroformo: alcohol isoamilico, 24:1)
- Etanol 96% y 70%
- Buffer TE 1X (10mM Tris-HCl pH = 8.0, 1mM EDTA)
- Buffer de Tris-borato (TBE) 1X

Metodología

1. Tomar 500 μ L de sangre periférica anticoagulada con EDTA y colocarlo en un tubo Eppendorf de 2 mL.
2. Agregar 200 μ L de buffer de lisis TSNT y mezclar por inversión.
3. Agregar 500 μ L de fenol saturado. Mezclar por inversión.
4. Agregar 100 μ L de sevag. Mezclar por inversión.
5. Cerrar el tubo y cubrir con parafilm
6. Homogenizar completamente el contenido del tubo en agitador vórtex por espacio de un minuto, hasta observar el contenido del tubo sin grumos. Retirar con cuidado el parafilm.
7. Añadir 200 μ L de TE y mezclar por inversión 1 minuto.
8. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
9. Recuperar la fase acuosa que se encuentra en la parte superior (sin tocar la interfase blanca) utilizando una micropipeta de 200 μ L y transferir a un tubo Eppendorf de 2 mL.
10. El ADN se precipita agregando lentamente dos volúmenes de etanol al 96%. Se mezcla por inversión hasta observar la precipitación del ADN en forma de hebra blanca.
11. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm. Descartar el sobrenadante.
12. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, mezclar y centrifugar igual que en el paso anterior y decantar con cuidado el sobrenadante.
13. Secar la pastilla al aire. Una vez seca agregar 50 a 100 μ L de TE, el volumen dependerá del tamaño de la pastilla. Resuspender completamente la pastilla de ADN agitando suavemente el fondo del tubo.

Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. En: Moore DD y Dowhan D Editores, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc.; 2003. p. 177-189.

Referencias

1. Hecht SS. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int J Cancer* 2012; 131 (12): 2724-32.
2. Malson JL, Sims K, Murty R, Pickworth WB. Comparison of the nicotine content of tobacco used in bidis and conventional cigarettes. *Tob Control* 2001; 10 (12): 181-3.
3. Raunio H, Rautio A, Gullste H, Pelkonen O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Clin Pharmacol* 2001; 52: 357-63.
4. Rossini A, Simao T, Albano RM, Pinto LFR. Review CYP2A6 polymorphisms and risk for tobacco-related cancers. *Pharmacogenomics* 2008; 9 (11): 1737-52.
5. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77 (3): 145-58.
6. Tyndale R, Pianezza ML, Sellers EM. A common genetic defect in nicotine metabolism decreases risk for dependence and lowers cigarette consumption. *Nicotine Tob Res* 1999; 1 (1): 63-7.
7. Weng Y, Fang C, Turesky RJ, Behr M, Kaminsky LS, Ding X. Determination of the role of target tissue metabolism in lung carcinogenesis using conditional cytochrome p450 reductase-null mice. *Cancer Res* 2007; 67 (16): 7825-32.
8. Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, et al. Cyp2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261 (3): 658-60.
9. Oscarson M, McLellan RA, Asp V, Ledesma M, Bernal ML, Sinues B, et al. Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6*12) that causes reduced CYP2A6 activity. *Hum. Mutat* 2002; 20 (4): 275-83.
10. Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al. The CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res* 2009; 69 (17): 6848-56.
11. Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, et al. Variation in nicotinic acetylcholine receptor

- genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35 (9): 1921-31.
12. Macqueen DA, Heckman BW, Blank MD, Janse Van Rensburg K, Park JY, Drobos DJ, et al. Variation in the α 5 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene predicts cigarette smoking intensity as a function of nicotine content. *Pharmacogenomics J* 2014; 14 (1): 70-6.
 13. Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J. Acetylcholine receptor (AChR) α 5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (α 4 β 2)₂ α 5 AChR function. *Mol Pharmacol* 2011; 79 (1): 119-25.
 14. Cho MH, Castaldi PJ, Wan ES, Siedlinski M, Hersh CP, Demeo DL, et al. A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (4): 947-57.
 15. Wilk JB, Shrine NRG, Loehr LR, Zhao JH, Manichaikul A, López LM, et al. Genome-wide association studies identify chrna5/3 and htr4 in the development of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186 (7): 622-32.
 16. David SP, Hamidovic A, Chen GK, Bergen AW, Wessel J, Kasberger JL, et al. Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in african americans. *Transl Psychiatry* 2012; 2 (3): 1-8.
 17. Freathy RM, Kazeem GR, Morris RW, Johnson PCD, Paternoster L, Ebrahim S, et al. Genetic variation at CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 interacts with smoking status to influence body mass index. *Int J Epidemiol* 2011; 40 (6): 1617-28.
 18. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Sulem P, Besenbacher S, Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, et al. A common biological basis of obesity and nicotine addiction. *Transl Psychiatry* 2013; 3 (10): 1-7.
 19. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. En: Moore DD y Dowhan D Editores, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.; 2003. p. 177-89.
 20. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008; 169 (9): 1163-71.
 21. Rodríguez S, Cook DG, Gaunt TR, Nightingale CM, Whincup PH, Day INM. Combined analysis of CHRNA5, CHRNA3 and CYP2A6 in relation to adolescent smoking behaviour. *J Psychopharmacol* 2011; 25 (7): 915-23.
 22. Siedlinski M, Cho MH, Bakke P, Gulsvik A, Lomas DA, Anderson W, et al. Genome-wide association study of smoking behaviours in patients with COPD. *Thorax* 2011; 66 (10): 894-902.
 23. Munafò MR, Timofeeva MN, Morris RW, Prieto-Merino D, Sattar N, Bernnan P, et al. Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and objective measures of tobacco exposure. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104 (10): 740-8.
 24. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, et al. CHRNA5 gene D398N polymorphism in japanese lung adenocarcinoma. *J Surg Res* 2010; 162 (1): 75-8.
 25. Doyle GA, Chou AD, Saung WT, Lai AT, Lohoff FW, Berrettini WH. Identification of CHRNA5 rare variants in african-american heavy smokers. *Psychiatr Genet* 2014; 24 (3): 102-9.
 26. Zhou H, Yang J, Li D, Xiao J, Wang B, Wang L, et al. Association of ireb2 and chrna3/5 polymorphisms with copd and copd-related phenotypes in a chinese han population. *J Hum Genet* 2012; 57 (11): 738-46.
 27. Jo Y-H, Talmage DA, Role LW. Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. *J Neurobiol* 2002; 53 (4): 618-32.
 28. Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, Dileone RJ, Gundisch D, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science* 2012; 332 (6): 1330-32.
 29. Taylor AE, Morris RW, Fluharty ME, Bjorngaard JH, Asvold BO, Gabrielsen ME, et al. Stratification by smoking status reveals an association of CHRNA5-A3-B4 genotype with body mass index in never smokers. *PLoS Genet* 2014; 10 (12): 1-6.
 30. Gruzca RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, et al. A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 2008; 64 (11): 922-9.
 31. Wang JC, Gruzca R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, et al. Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mrna levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 2009; 14 (5): 501-10.
 32. Avena NM, Gold JA, Kroll C, Gold MS. Further developments in the neurobiology of food and addiction: update on the state of the science. *Nutrition* 2012; 28 (4): 341-3.
 33. Avena NM, Gold MS. Variety and hyperpalatability: are they promoting addictive overeating. *Am J Clin Nutr* 2011; 94 (6): 367-8.
 34. Zhu AZX, Renner CC, Hatsukami DK, Benowitz NL, Tyndale RF. CHRNA5-A3-B4 genetic variants alter nicotine intake and interact with tobacco use to influence body weight in Alaska Native tobacco users. *Addiction* 2013; 108 (10): 1818-28.