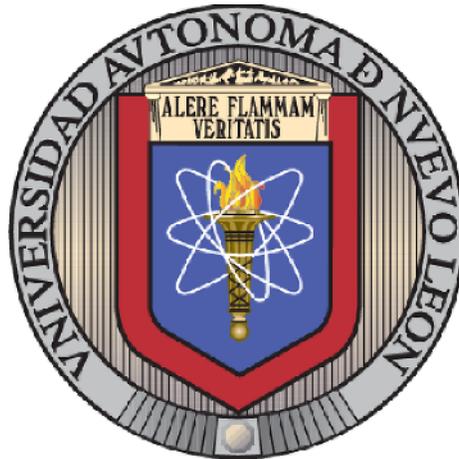


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS FARMACOGENÉTICO DE LA NICOTINA EN
SUJETOS JÓVENES FUMADORES Y NO FUMADORES**

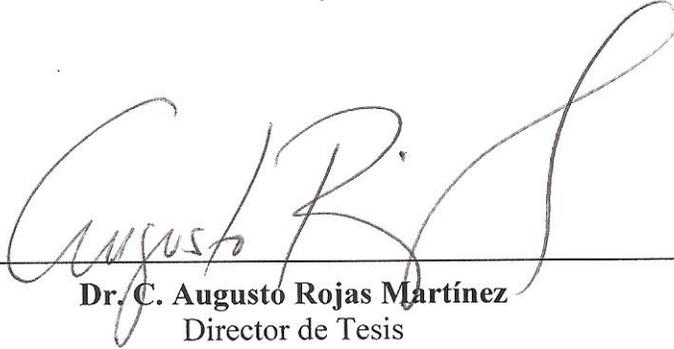
POR: M.C. GISSELA BORREGO SOTO

**Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Noviembre 2015

Análisis Farmacogenético de la Nicotina en Sujetos Jóvenes Fumadores y No Fumadores

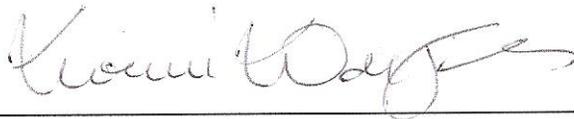
Aprobación de tesis:



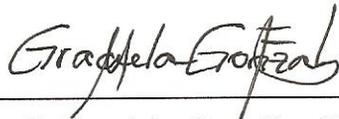
Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis



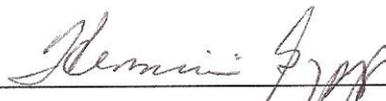
Dra. C. Rocío Ortiz López
Co- Director de Tesis



Dra. C. Noemí Waksman Minsky
Miembro de Tesis



Dra. C. Graciela González Farías
Miembro de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Co-Dirección de la Dra. Rocío Ortiz López, la Dra. Noemí Waksman Minsky, la Dra. Graciela González Farías y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Gracias:

Al Dr. Augusto por la dirección en este trabajo, por sus asesorías, enseñanzas, consejos, confianza durante todos estos años.

A la comisión de tesis, la Dra. Noemí Waksman Misnky, la Dra. Graciela González Farías y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

Al Dr. Antonio Costilla Esquivel y al Dr. Gerardo Padilla Rivas por su tiempo y dedicación

Al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por darme la oportunidad de realizar el doctorado mientras cumplía con mis actividades docentes. A Juany, Ariadna y a todo el personal que siempre me estuvo apoyando.

A mi esposo David, mi compañero de vida, mi principal soporte, gracias por tu cariño, comprensión en los momentos difíciles y hasta asesorías. Gracias por ser parte de esto y por ayudarme a salir adelante.

A mis compañeros del Laboratorio de Terapia Génica y la Unidad de Terapias Experimentales: Cecy, Paulina, Alex, Nancy, Fátima, Nidia, Jorge, Iván por sus consejos, ayuda, compañía y por todos los momentos divertidos que pasamos haciendo más placentera esta etapa.

Gracias a todos los que me brindaron su mano, ayudándome en la realización de este proyecto

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.1. Epidemiología	2
1.1.2. Adicción a la nicotina	4
1.1.3. Variantes genéticas en la subunidad $\alpha 5$ de nAChR	7
1.1.4. Variantes del gen <i>CHRNA5</i> y su relación con el índice de masa corporal (IMC)	8
1.1.5. Nicotina	10
1.1.5.1. Absorción de la nicotina	10
1.1.5.2. Metabolismo de la nicotina	10
1.1.6. Variabilidad genética del gen <i>CYP2A6</i>	13
1.1.6.1. Variantes de <i>CYP2A6</i> relacionadas al metabolismo de la nicotina y derivados	14
1.1.6.1.1. <i>CYP2A6*12</i>	14
1.1.6.1.2. <i>CYP2A6*1D</i>	15
1.1.7. Polipéptidos transportadores aniónicos orgánicos (OATPs)	15
1.2. Justificación	18
1.3. Hipótesis	19
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo general	21

2.2. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Materiales y reactivos	22
3.2. Estrategia general	23
3.3. Métodos	24
3.3.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes en los genes seleccionados, EHW para el cálculo del número muestral.	24
3.3.1.1. Sujetos de estudio	24
3.3.1.2. Genotipificación	24
3.3.2. Recolección de muestras de sujetos jóvenes fumadores y no fumadores de distintas facultades de la UANL	25
3.3.3. Cuantificación de cotinina en plasma	25
3.3.4. Genotipificación de <i>CHRNA5</i> (rs16969968), <i>SCLO3A1</i> (rs1517618), <i>CYP2A6*1D</i> (rs4803381) y <i>CYP2A6*12</i>	26
3.3.4.1. <i>CHRNA5</i> (rs16969968)	26
3.3.4.2. <i>SCLO3A1</i> (rs1517618)	27
3.3.4.3. <i>CYP2A6*1D</i> (rs4803381)	27
3.3.4.4. <i>CYP2A6*12</i>	28
3.3.5. Análisis estadístico	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	31
4.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes en los genes seleccionados y el equilibrio de Hardy Weinberg en sujetos de noreste de México	31
4.1.1. Cálculo del número muestral para cada variante	32
4.1.2. Análisis de comparación de frecuencias genotípicas de diferentes poblaciones	33
4.2. Análisis de variantes demográficas de jóvenes fumadores y no fumadores participantes del estudio	34
4.3. Análisis de cotinina plasmática en fumadores y no fumadores	37

4.4. Asociación de la concentración de cotinina con el IMC agrupado	41
4.5. Análisis de frecuencias alélicas y genotipificación de las variantes rs16969968 de <i>CHRNA5</i> , <i>CYP2A6*12</i> , <i>CYP2A6*1D</i> y rs1517618 de <i>SLCO3A1</i>	42
4.6. Análisis de asociación de la distribución alélica y genotípica de la variantes rs16969968 de <i>CHRNA5</i> , <i>CYP2A6*12</i> , rs1517618 de <i>SLCO3A1</i> y el hábito de fumar	42
4.7. Análisis de asociación de las variantes rs16969968 de <i>CHRNA5</i> , <i>CYP2A6*12</i> rs1517618 de <i>SLCO3A1</i> y cotinina en fumadores y no fumadores	44
4.8. Asociación de los genotipos de las variantes rs16969968 de <i>CHRNA5</i> , <i>CYP2A6*12</i> , rs1517618 de <i>SLCO3A1</i> y el IMC	47
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	48
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	66
ANEXO 1. Encuesta para los participantes del proyecto análisis toxicológicos y toxicogenómicos para un grupo seleccionado de carcinógenos del tabaco en sujetos jóvenes voluntarios	66
ANEXO 2. 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))	69

LISTA DE FIGURAS

	Página	
Figura 1.	Principales causas de muerte en el mundo según la OMS en el año 2012	3
Figura 2.	Receptores nAChR	5
Figura 3.	El papel del sistema dopaminérgico en el consumo de nicotina	6
Figura 4.	Metabolismo de la nicotina a cotinina	12
Figura 5.	Variante <i>CYP2A6*12</i>	15
Figura 6.	Mecanismo de transporte de aniones orgánicos en el túbulo proximal	17
Figura 7.	Estrategia general	23
Figura 8.	Comparación de frecuencias genotípicas de diferentes poblaciones con la población del Noreste de México analizada en este estudio	33
Figura 9.	Prevalencia del consumo activo de tabaco en sujetos de 18 a 35 años de edad	34
Figura 10.	Consumo de CPD	35
Figura 11.	Edad en la que fumaron por primera vez y edad a la que empezaron a fumar diariamente	35
Figura 12.	Consumo de alcohol en mujeres y hombres fumadores y no fumadores	36
Figura 13.	IMC bajo a normal, sobrepeso y obesidad en fumadores y no fumadores	37
Figura 14.	Curva estándar para el cálculo de concentración de cotinina plasmática	38
Figura 15.	Análisis de cotinina plasmática en fumadores y no fumadores	39
Figura 16.	Concentración de cotinina plasmática (ng/mL) y CPD	40
Figura 17.	Concentración de cotinina plasmática (ng/mL) y CPD agrupados	40
Figura 18.	Curva ROC curva para evaluar la sensibilidad y especificidad de los distintos valores de corte de cotinina plasmática para identificar los fumadores activos	41
Figura 19.1.	Concentración de cotinina plasmática y su asociación con los genotipos de las variantes <i>CYP2A6*12</i> y rs1517618 de <i>SLCO3A1</i> en fumadores y no fumadores	45
Figura 19.2.	Concentración de cotinina plasmática y CPD y su asociación con los genotipos de la variante rs16969968 de <i>CHRNA5</i>	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.	30
Lista de variantes analizadas y condiciones de análisis para el cálculo de equilibrio de Hardy-Weinberg y frecuencias alélicas y genotípicas de 100 muestras de ADN de sujetos sanos, extraídas de un banco de muestras.	
Tabla 2.	31
Frecuencias alélicas y genotípicas y EHW de algunas variantes en genes de la familia <i>CYP450</i> y <i>GSTP1</i> en sujetos sanos no fumadores.	
Tabla 3.	32
Frecuencias alélicas y genotípicas de algunas variantes en genes de la familia <i>CYP450</i> y <i>GSTP1</i> en sujetos sanos fumadores.	
Tabla 4.	42
Asociación de la concentración de cotinina plasmática y el IMC agrupado en bajo a normal ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($> 25 - < 30 \text{ kg/m}^2$) y obesidad ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$).	
Tabla 5.	46
Frecuencias alélicas y genotípicas de algunas variantes de genes relacionados con el metabolismo de la nicotina en sujetos fumadores y no fumadores.	
Tabla 6.	46
Asociación del hábito de fumar y las distribuciones alélicas y genotípicas de las variantes rs16969968 de <i>CHRNA5</i> , <i>CYP2A6*12</i> y rs1517618 de <i>SLCO3A1</i> .	
Tabla 7.	48
Asociación de las variantes alélicas y genotípicas con el IMC agrupado de bajo a normal ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), con sobrepeso ($> 25 - < 30 \text{ kg/m}^2$) y con obesidad ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$).	

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona
NNAL	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos
IARC	Agencia Internacional de Investigación Contra el Cáncer
AUC	Área bajo la curva
AVT	Área ventral tegmental
N	Asparagina
D	Aspartato
ROC	Característica Operativa del Receptor
CYPs	Citocromos
CPD	Cigarrillos por día
CYP450	Citocromo P450
DO	Densidad óptica
ENA	Encuesta nacional de adicciones
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EHW	Equilibrio de Hardy Weinberg
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
CHRNA5	Gen de la subunidades $\alpha 5$ de los receptores de acetilcolina nicotínicos
SLCO	Genes de los transportadores de solutos orgánicos aniónicos
E	Glutamato
GSTP1	Glutación S transferasa 1
HT	Heterocigoto

HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HM	Homocigoto mutado
HS	Homocigoto silvestre
IMC	Índice de masa corporal
ELISA	Inmunoenayo de adsorción ligado a enzimas
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramos
pKa	Logaritmo de la constante de disociación
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mL	Militros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
OMS	Organización mundial de la salud
pb	Pares de bases
HRP	Peroxidasa de rábano
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
OATPs	Polipéptidos transportadores aniónicos orgánicos
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
nAChR	Receptores de acetilcolina nicotínicos
SNC	Sistema nervioso central
DA	Sistema dopaminérgico
SNP	Sistema nervioso periférico
3HC	Trans-3'-hidroxicotina
Vglut1	Transportador vesicular de glutamato 1
TSNT	Tritón X-100, SDS, NaCl, Tris-HCl
UDM	Unidad de diagnóstico molecular
UGTs	Uridil-glucuronosil-transferasas

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El tabaquismo es un problema de salud que afecta la expectativa y la calidad de vida de los fumadores y se ha relacionado con un gran número de enfermedades, principalmente el cáncer de pulmón. La nicotina es el componente adictivo del tabaco más importante, el cual se une a receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR, por sus siglas en inglés) y activa la liberación de dopamina que causa los efectos placenteros deseados por los fumadores (Harris *et al.* 2015). La duración de los efectos neurológicos y la concentración de nicotina en el organismo dependen de su metabolismo. La nicotina es metabolizada principalmente en el hígado por la enzima CYP2A6, aunque también puede metabolizarse en otros órganos como los pulmones. La cotinina es el principal metabolito de la nicotina, el cual surge de la oxidación microsomal de la nicotina catalizada por la enzima CYP2A6, tiene una vida media de hasta 40 horas y se ha utilizado ampliamente como un biomarcador de exposición al humo del cigarrillo. Numerosos estudios han reportado que el gen de la enzima CYP2A6 es altamente polimórfico y que existen más de 35 variantes que pueden estar asociadas con el hábito de fumar y con el rechazo al tabaco (Tanner *et al.* 2015). Se ha planteado que los sujetos con variantes genéticas que disminuyan la actividad enzimática de CYP2A6 (metabolizadores lentos) pueden tener un menor riesgo de dependencia al tabaco, fuman una menor cantidad de cigarrillos por día, tienen mayor probabilidad de dejar de fumar y por lo tanto menor riesgo de enfermedades provocadas por el tabaquismo (McDonagh, *et al.* 2012). También se ha reportado que las variantes genéticas en los nAChR pueden disminuir la sensibilidad a la nicotina y esto puede contribuir a los comportamientos adictivos al tabaco (Morel *et al.* 2014).

Por otro lado, los fumadores suelen tener un índice de masa corporal (IMC) bajo en comparación con los sujetos no fumadores y el abandono del hábito de fumar se asocia a incremento de peso. Estos efectos se han atribuido a que la nicotina aumenta el metabolismo y suprime el apetito (Thorgeirsson *et al.* 2013). Se han identificado mecanismos moleculares neuronales del sistema nervioso central (SNC) implicados en la disminución de la ingesta de alimentos inducida por la nicotina en los que está involucrada

la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y la activación del sistema de recompensa cerebral (Morel *et al.* 2014). Las variantes genéticas en los nAChR podrían estar involucradas en el aumento ó disminución de IMC en fumadores y no fumadores. Es importante identificar variantes genéticas que caractericen a los sujetos en riesgo de adicción a la nicotina y aumento de peso y así prevenir las enfermedades asociadas al tabaquismo.

1.1. Antecedentes.

El tabaquismo es la principal causa prevenible de muerte y enfermedad en el mundo. Es un serio problema de salud que se relaciona con un gran número de enfermedades, entre ellas las enfermedades isquémicas cardiovasculares, las enfermedades cerebrovasculares, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/es/>), estas enfermedades se encontraron dentro de las principales causas de muerte en el mundo, en el año 2012 (Figura 1). El tabaquismo también está relacionado con el desarrollo de tumores en diversos sitios del organismo como cabeza, cuello, vejiga, etc. El cáncer de pulmón se encuentra en primer lugar en incidencia y mortalidad en hombres, según las estadísticas mundiales de GLOBOCAN y en México se encuentra en segundo lugar (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>).

1.1.1. Epidemiología.

En el mundo existen más de mil millones de fumadores. El 80% vive en países en vías de desarrollo, donde es mayor el número de muertes asociadas al tabaco. Además, más de 600,000 personas son fumadoras pasivas. La exposición al humo del tabaco causa muerte súbita en los lactantes y en mujeres embarazadas ocasiona bajo peso del recién nacido. El tabaco causó 100 millones de defunciones en el siglo XX y la OMS estima que si no se tiene un control adecuado, las defunciones aumentarán hasta más de ocho millones en el año 2030, causando el mayor número de muertes en los países en vías de desarrollo (<http://www.who.int/es/>).



Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo según la OMS en el año 2012.

México no está exento de esta epidemia globalizada. En este país, el consumo de tabaco ocasiona más de 60,000 muertes al año (Kuri-morales *et al.* 2006). Además impacta negativamente la economía familiar (Vázquez LA *et al.* 2002) e implica pérdida de productividad laboral, mortalidad prematura y elevados costos para el sector salud. El tabaquismo es un grave problema especialmente en los adolescentes, adultos jóvenes y mujeres, con una tendencia al incremento en la frecuencia de consumo y la exposición al humo del tabaco (Encuesta Nacional de Adicciones, 2011) (Medina ME *et al.* 2006). Según la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA) realizada en el año 2011, en México existe una prevalencia de consumo activo de tabaco de 21.7%, lo que corresponde a 17.3 millones de mexicanos fumadores en la población de 12 a 65 años. El 31.4% de los hombres y el 12.6% de las mujeres son fumadores activos. El 8.9% de la población en este grupo de edad reportó fumar diariamente (7.1 millones; 13.2% de los hombres y 4.8% en mujeres) (Encuesta Nacional de Adicciones, 2011). Por otro lado, en México el cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en hombres y el octavo en mujeres (<http://www.who.int/es/>). El cáncer de pulmón se diagnostica en etapas tardías en un 95% de los casos, en las etapas III y IV, en los que ya se ha diseminado a otros tejidos y órganos como el cerebro o el hígado y las opciones terapéuticas son muy limitadas. Aunque el

mayor factor de riesgo de cáncer de pulmón es fumar, se sabe que un pequeño porcentaje de los fumadores no desarrollan este tipo de cáncer, por esto los factores genéticos pueden ser factores de riesgo importantes en la etiología del cáncer de pulmón en fumadores. No hay a la fecha marcadores genéticos de predisposición a esta enfermedad.

El humo de tabaco contiene más de 5,000 sustancias tóxicas y se sabe que 60 de ellas son sustancias cancerígenas. Entre ellas se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y aminas aromáticas principalmente (Talhout *et al.* 2011). También contiene sustancias altamente adictivas como la nicotina y recientemente se ha propuesto que otros constituyentes del tabaco, como los alcaloides nornicotina y anabasina también pueden contribuir a la adicción. Si bien, a la nicotina no se le ha considerado como una sustancia cancerígena, es responsable de las enfermedades asociadas al tabaquismo (Harris *et al.* 2015). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que la nicotina induce mutaciones, promueve la inestabilidad mediada por el estrés oxidativo y está implicada en el proceso de carcinogénesis (Grando 2014). Aun así, la nicotina se utiliza cada vez más como un agente terapéutico para dejar de fumar. Este mercado está creciendo rápidamente y se espera que llegue a \$2,3 mil millones de usuarios para el año 2016, además del consumo de nicotina a través del tabaco (Bavarva *et al.* 2014).

1.1.2. Adicción a la nicotina.

La adicción se define como una enfermedad crónica y recurrente del SNC que se caracteriza por la búsqueda y el consumo compulsivo de drogas, a pesar de sus consecuencias nocivas. Se considera una enfermedad del cerebro porque las drogas modifican este órgano (<http://www.drugabuse.gov>). Aunque la nicotina desempeña un papel menor en el desarrollo de enfermedades, la adicción a ésta es la causa inmediata. La adicción al tabaco, como todas las adicciones a las drogas, involucra la interacción de factores farmacológicos, sociales, genéticos y también es debida a la fuerte publicidad en favor del tabaco. La nicotina ingresa al organismo y activa la liberación de neurotransmisores que modulan el estado de ánimo, mejoran el rendimiento, entre otros efectos placenteros y esto provoca que las personas desarrollen adicción al cigarrillo.

La nicotina ingresa por vía aérea, a través del humo del cigarrillo y llega a los pulmones en donde es absorbida por los alvéolos. Una vez en el torrente sanguíneo, la nicotina cruza la barrera hematoencefálica y llega rápidamente al cerebro. En el cerebro la nicotina ingresa al área ventral tegmental (AVT) y se une a los nAChR. Estos receptores son canales iónicos pentaméricos de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) que están presentes tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). La entrada de estos iones puede producir excitación celular ó activar a proteínas intracelulares sensibles al Ca^{2+} como la proteína quinasa C, proteína quinasa A, calmodulina, entre otras (Turner *et al.* 2013). Los nAChR están formados por unidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y/o β ($\beta 2$ - $\beta 4$) y pueden ser homoméricos o heteroméricos (Hendrickson *et al.* 2013) (Figura 2).

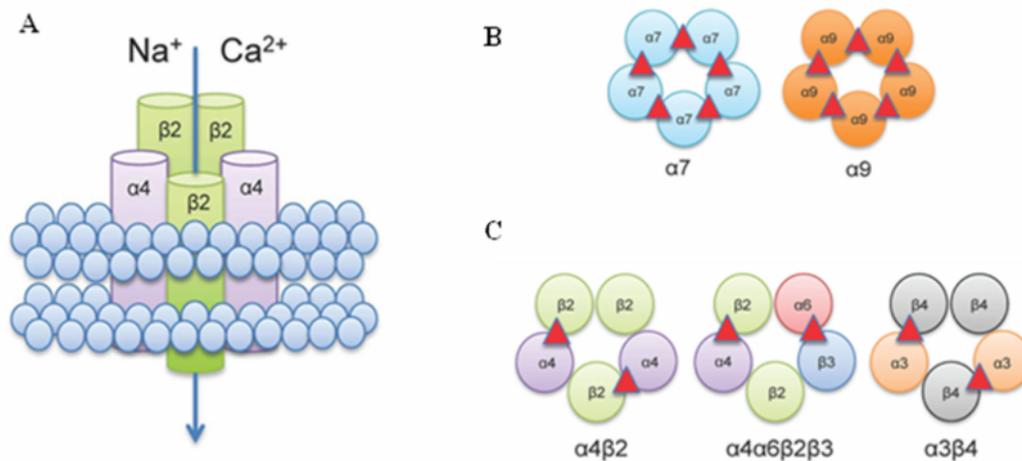


Figura 2. Receptores nAChR. (A) Los receptores nAChR son canales de Na^+ y Ca^{2+} , están formados por subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y/o β ($\beta 2$ - $\beta 4$), y pueden ser (B) homoméricos ó (C) heteroméricos (Hendrickson *et al.* 2013).

Estos receptores son activados endógenamente por la unión de acetilcolina. La etapa limitante de la velocidad en la síntesis de la acetilcolina (ACh) es la disponibilidad de colina en la célula. Sin embargo la nicotina, análogo de la acetilcolina, activa a estos receptores y modula la liberación de neurotransmisores como la dopamina, norepinefrina, acetilcolina, glutamato, serotonina, endorfinas y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

La dopamina es el neurotransmisor más involucrado en la adicción al tabaco; este neurotransmisor es liberado en el sistema mesolímbico y viaja desde el AVT hacia el núcleo accumbens. Esta vía está implicada con las propiedades gratificantes de la nicotina y otras drogas de abuso proporcionando efectos placenteros (Klinke & Jonsdottir 2014) (Figura 3). La exposición repetida a la nicotina resulta en procesos neuroadaptativos que incluyen la inactivación y desensibilización de los nAChR, seguido de la necesidad de dosis más elevadas de nicotina para lograr los efectos placenteros. Esto contribuye al desarrollo de la tolerancia y de los síntomas de abstinencia tras la retirada abrupta del consumo de cigarrillos o la administración de nicotina.

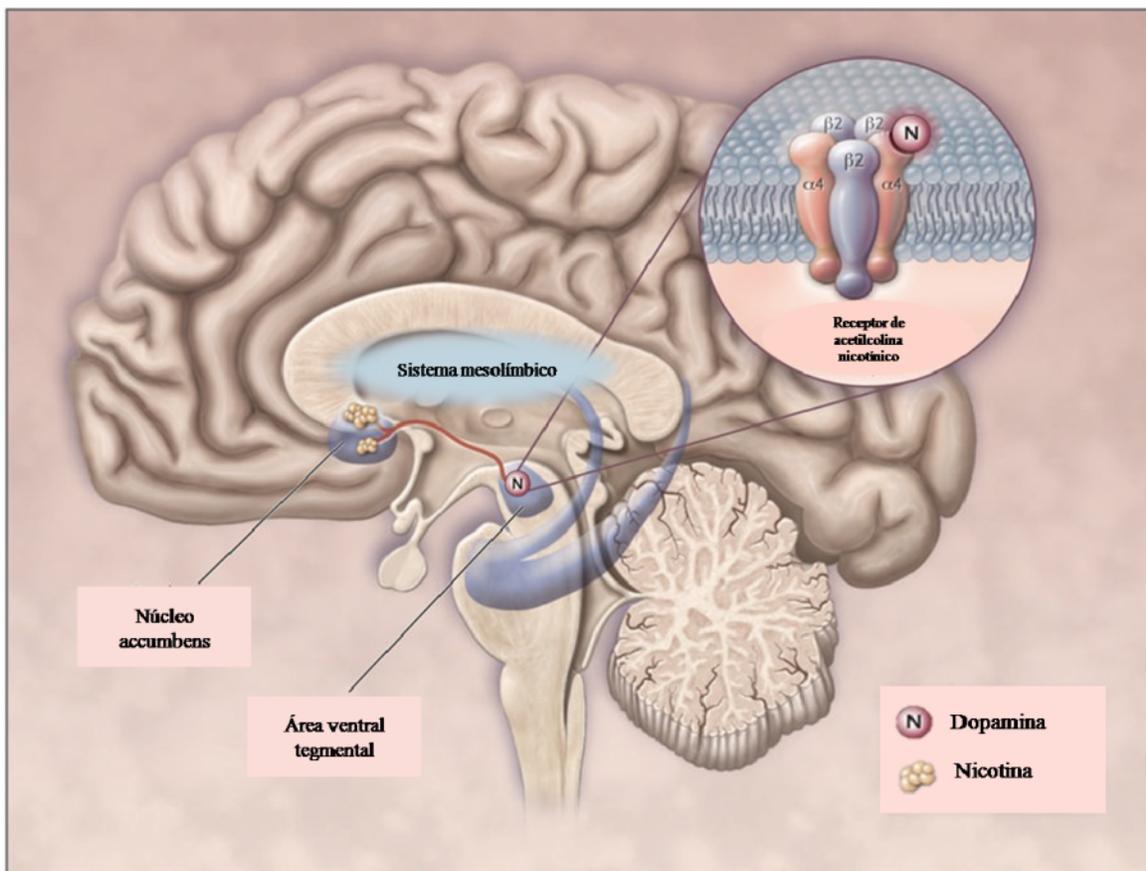


Figura 3. El papel del sistema dopaminérgico en el consumo de nicotina. La nicotina se une a los receptores nAChR en el AVT, resultando en la liberación de dopamina que es transportada al núcleo accumbens (Benowitz 2010).

1.1.3. Variantes genéticas en la subunidad $\alpha 5$ de nAChR.

Recientes estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) identificaron asociaciones entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes de las subunidades α y β de los nAChR (*CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4*) y la susceptibilidad a la dependencia al tabaco, EPOC y el desarrollo de cáncer de pulmón (Siedlinski *et al.* 2011, Yang *et al.* 2013, Wen *et al.* 2014). En particular, el cambio de G>A en la posición 1,354 del gen *CHRNA5* (variante rs16969968) de la subunidad $\alpha 5$ del nAChR causa un cambio de aspartato a asparagina (D398N) que resulta en la disminución de la permeabilidad de los nAChR al Ca^{2+} que contienen la subunidad $\alpha 5$ y tiene como consecuencia la desensibilización del receptor por la nicotina. Este cambio sugeriría que los portadores requieren incrementar el consumo de nicotina para alcanzar los efectos gratificantes de este alcaloide en el SNC (Kuryatov *et al.* 2011).

Morel y colaboradores analizaron el papel de la subunidad $\alpha 5$ de nAChR en el sistema dopaminérgico (DA) usando un modelo murino, monitorearon los cambios electrofisiológicos y la autoadministración de nicotina. Ellos observaron que la delección de la subunidad $\alpha 5$ de nAChR tiene como consecuencia la pérdida de control del consumo de nicotina y la necesidad de altas dosis de droga provocando cambios en la respuesta electrofisiológica. Además observaron que el alelo A de *CHRNA5* (rs16969968) induce una pérdida parcial de la función e incrementa la concentración mínima de nicotina necesaria para la activación del sistema DA. Por lo tanto, la subunidad $\alpha 5$ expresada en las neuronas DA del AVT es crucial para el control del consumo mínimo necesario para la activación del sistema DA y el alelo A disminuye la sensibilidad a la nicotina (Morel *et al.* 2014).

En un estudio de Fowler y colaboradores investigaron el papel de la subunidad $\alpha 5$ y los efectos de la nicotina en el sistema de recompensa del cerebro en un modelo murino. Ellos proponen que esta subunidad regula los efectos inhibitorios de recompensa, por lo tanto una disrupción de la subunidad $\alpha 5$ aumenta el rango de dosis de nicotina que promueve la actividad de recompensa del cerebro, lo cual puede ayudar a explicar la asociación de la adicción al tabaco con el alelo A del gen *CHRNA5* (Fowler *et al.* 2013).

Jensen y colaboradores investigaron los efectos del alelo A de la variante rs16969968 y la reducción de los efectos aversivos a la nicotina en sujetos fumadores crónicos europeos-americanos y afro-americanos. En este estudio se demostró una fuerte asociación del alelo A de rs16969968 con los sujetos fumadores crónicos y que éste alelo reduce los efectos aversivos a la nicotina. También se asoció con una mejora de rendimiento en la prueba cognitiva y menores puntuaciones en la abstinencia. Además, en sujetos homocigotos para el alelo G se observó una pronunciada respuesta aversiva a la nicotina. Por lo tanto, la disminución de la aversión a la nicotina podría reducir la respuesta inhibitoria y aumentar los efectos de la droga (Jensen *et al.* 2015).

En un estudio de Macqueen y colaboradores donde analizaron la variante rs16969968 de *CHRNA5* y su asociación con la intensidad del hábito de fumar (volumen de humo aspirado), encontraron que esta variante se asocia con el volumen total de humo de cigarrillo aspirado y demostraron que no fue diferente entre los portadores del alelo A (AG y AA), pero sí se encontraron diferencias con los homocigotos GG. Ninguna de las medidas como cigarrillos por día, edad de primer cigarrillo, edad a la que iniciaron a fumar diariamente ó la prueba de la dependencia a la nicotina fueron asociados con la variante rs16969968 de *CHRNA5* (Macqueen *et al.* 2014).

Estos estudios validan los resultados de los análisis de asociación entre el alelo A de la variante rs16969968 del gen *CHRNA5* y el tabaquismo y proponen mecanismos hipotéticos basados en estudios funcionales y de comportamiento de la subunidad $\alpha 5$.

1.1.4. Variantes del gen *CHRNA5* y su relación con el índice de masa corporal (IMC).

Estudios epidemiológicos han relacionado el hábito de fumar con la disminución del IMC (Freathy *et al.* 2011), debido a que la nicotina disminuye el apetito y aumenta el metabolismo corporal (Thorgeirsson *et al.* 2013). También llama la atención el mayor consumo de alimentos y el aumento de peso que resulta después de dejar de fumar en el 70-80% de las personas (Jo *et al.* 2002). Existen variantes genéticas de las subunidades α de los nAChR asociadas con el tabaquismo, como las mencionadas anteriormente. Si el hábito de fumar está asociado con bajo IMC, es de esperarse que los alelos que predisponen a

fumar estén asociados con bajo IMC en personas que fuman, pero los mecanismos biológicos que conectan el tabaquismo y la obesidad no están completamente entendidos (Freathy *et al.* 2011).

La nicotina y otras drogas adictivas activan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y tienen como resultado la activación del sistema de recompensa cerebral (Nutt *et al.* 2015). Estudios en animales y en humanos han revelado que circuitos neurológicos similares a los generados en la regulación de la recompensa y del refuerzo en la adicción a las drogas, también están involucrados en la hiperfagia (pérdida de control y el consumo excesivo de alimentos) (Thorgeirsson *et al.* 2013). Sin embargo, en contraste con las drogas, la regulación de las conductas alimentarias se modulan por múltiples mecanismos periféricos y centrales para transmitir información al sistema DA, como lo son algunas hormonas y citocinas (por ejemplo leptina, insulina, colecistocinina, factor de necrosis tumoral alfa) y nutrientes como los azúcares y los lípidos. Estas vías de señalización aseguran que se consuman alimentos cuando sea necesario. Sin embargo, el consumo repetido a los alimentos altamente apetecibles (como los alimentos con altas cantidades de grasas, sales y azúcares) puede anular las señales de saciedad y promover el consumo compulsivo de grandes cantidades de estos alimentos a pesar de la sobrecarga de nutrición. Esta pérdida de control es similar a los patrones observados en la adicción a las drogas y ha llevado a la descripción de la obesidad como una forma de adicción a la comida (Volkow *et al.* 2013). Asimismo, diferentes estudios han reportado que la disrupción del sistema DA está implicado en la pérdida de control en la adicción a las drogas y en la obesidad (Volkow *et al.* 2012, Ziauddeen *et al.* 2015). La sensación de saciedad después de una comida atenúa la respuesta hacia los alimentos con alto contenido calórico en el núcleo accumbens. Este cambio de actividad está relacionado con una baja palatabilidad y conductas alimentarias saludables, mientras que en sujetos obesos, las comidas hipercalóricas producen respuestas anormales en el núcleo accumbens. Se ha sugerido que esta región puede ser un blanco prometedor para tratar la obesidad.

1.1.5. Nicotina.

La nicotina es responsable de la adicción al tabaco y la duración de los efectos neurológicos depende de su metabolismo. Es una amina natural de las hojas del tabaco que está compuesta por un anillo de piridina y pirrolidina. Los efectos de la nicotina en el organismo consisten en un aumento de la frecuencia del pulso cardíaco, la presión sanguínea, un aumento de los ácidos grasos libres en plasma, la movilización de glucosa en la sangre y un aumento de catecolaminas (Benowitz 2010b). Fumar cigarrillos es la forma más frecuente de consumo de nicotina. La concentración promedio de nicotina en los cigarrillos es de 10 a 14 mg y la media de la nicotina absorbida al fumar es de 1 a 1.5 mg (Malson *et al.* 2001).

1.1.5.1. Absorción de la nicotina.

La absorción de la nicotina puede ocurrir a través de la cavidad oral, las fosas nasales, la piel, los pulmones, la vejiga urinaria y el tracto gastrointestinal. La velocidad de absorción a través de las membranas biológicas es un proceso dependiente del pH. La nicotina es una base débil (alcaloide) que tiene un $pK_a = 8.0$, por lo tanto en ambientes ácidos, se encuentra en estado ionizado y no se absorbe eficientemente. La principal ruta de absorción en los fumadores es a través de los alveólos de los pulmones. El pH de la fracción acuosa del humo del cigarrillo es de alrededor de 8.5 y el pH de los alveolos es de 7.4. A este pH cerca del 31% de la nicotina no se encuentra ionizada, por lo tanto circula fácilmente a través de las membranas celulares alveolares hacia la circulación sanguínea y es transportada a diferentes tejidos. Estudios de autopsias de sujetos fumadores han mostrado que la nicotina tiene alta afinidad por tejidos como el hígado, el cerebro, los riñones, el bazo y los pulmones y baja afinidad por el tejido adiposo (Benowitz 2009).

1.1.5.2. Metabolismo de la nicotina.

La nicotina se metaboliza ampliamente y tiene una vida media corta de alrededor de 2 horas en plasma (Cross *et al.* 2014). El metabolismo de la nicotina puede dividirse en dos fases. La fase I consiste en la oxidación microsomal de la nicotina por las enzimas de la familia CYP450, principalmente CYP2A6. Posteriormente, en la fase II la nicotina se glucuroniza por acción de las enzimas uridil-glucuronosil-transferasas (UGTs). La nicotina se metaboliza principalmente en el hígado, pero también se ha demostrado que puede ocurrir en otros órganos como en los pulmones. En humanos cerca del 70 a 80% de la nicotina es

convertida a cotinina y cuantitativamente éste es el metabolito más importante de la nicotina (Mattes *et al.* 2015). La cotinina tiene una vida media de hasta 40 horas y se ha utilizado ampliamente como un biomarcador de exposición al humo del cigarrillo (Baltar *et al.* 2011, Yuan *et al.* 2014). La primera fase del metabolismo de la nicotina a cotinina está mediado por la enzima CYP2A6, la cual produce $\Delta^{1,(5)}$ -ion iminium-nicotina que está en equilibrio con 5'-hidroxicotinina (uno de los metabolitos primarios de la nicotina). Posteriormente, la enzima *aldehído oxidasa* oxida al $\Delta^{1,(5)}$ -ion iminium-nicotina a cotinina. Aunque la mayoría de la nicotina es metabolizada a cotinina, solo del 10 al 15% de la nicotina absorbida aparece en la orina como cotinina. Posteriormente la cotinina es convertida a trans-3'-hidroxicotinina (3HC) por la enzima CYP2A6, que es responsable del 100% de su transformación química. La 3HC es el principal metabolito detectado en la orina de fumadores y la relación 3HC/cotinina se ha utilizado como un marcador de actividad de CYP2A6, debido a que la actividad de CYP2A6 muestra una alta variabilidad interindividual (Tanner *et al.* 2015). En la segunda fase del metabolismo la cotinina y la 3HC son glucuronizadas por acción de las enzimas UGTs para producir N-glucurónido de cotinina y O-glucurónido de 3HC, lo que resulta en moléculas que son más polares y por lo tanto de fácil excreción por la orina (Figura 4).

Por otro lado, el procarcinógeno 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) es resultado de la combustión de la nicotina. Éste es específico del humo del cigarrillo y también es metabolizado por las enzimas CYP450 y enzimas transferasas (Appleton *et al.* 2014). La NNK se transforma a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) en la primera fase de su metabolismo, la cual es altamente carcinógena, pues puede formar aductos en el ADN (Figura 4) y producir mutaciones importantes, como mutaciones en el gen *K-RAS* asociadas con el desarrollo de cáncer en modelos murinos (Vardavas *et al.* 2012, Duell 2012). La Agencia Internacional de Investigación Contra el Cáncer (IARC) ha clasificado a la NNK dentro del grupo I de carcinógenos por su comprobada asociación con desarrollo de cáncer (<http://www.iarc.fr>). Estudios de Hecht y colaboradores demostraron que la 2' hidroxilación de la cotinina puede producir cetoácidos y a partir de estos generar NNK en un 5.7% del total de cotinina producida, por lo tanto la NNK podría formarse de manera endógena en las personas que utilizan los productos de tabaco, lo que resulta en la

exposición a este agente cancerígeno. También es posible que la NNK podría estar formándose endógenamente durante la terapia de reemplazo con nicotina (Hecht *et al.* 2000).

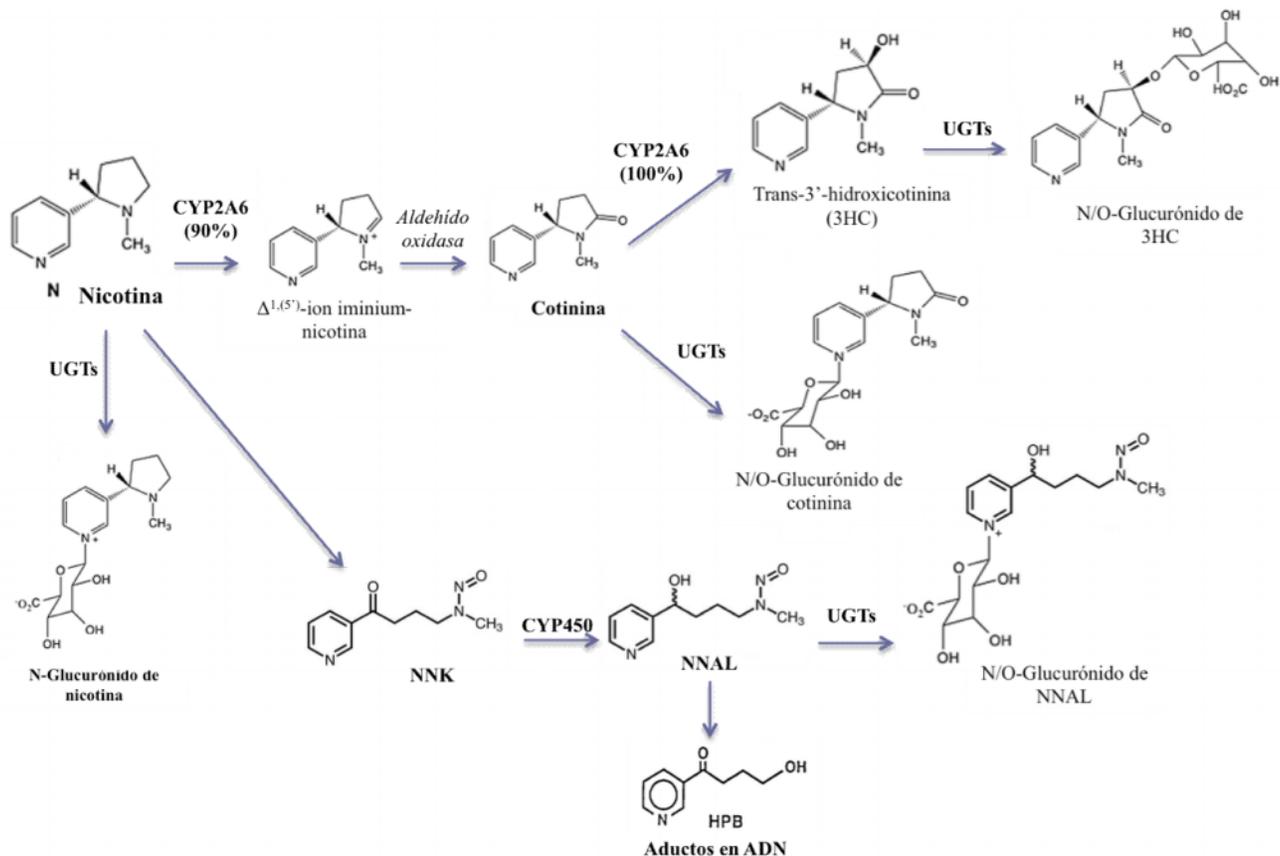


Figura 4. Metabolismo de la nicotina a cotinina. En la primera fase del metabolismo actúan las enzimas CYP450 que oxidan a la nicotina a $\Delta^{1,5}$ -ion iminium-nicotina y posteriormente la *aldehído oxidasa* la oxida a cotinina. La cotinina puede oxidarse posteriormente a 3HC por la enzima CYP2A6. La combustión de la nicotina produce NNK. La nicotina también puede producir NNK de manera endógena pero solo un 5.7% del total de cotinina. Asimismo, la NNK es oxidada por las enzimas CYP450 convirtiéndola en NNAL. En la segunda fase del metabolismo las enzimas UGT transfieren un grupo glucurónido a la cotinina, 3HC y NNAL para facilitar su excreción por la orina. La nicotina también puede ser glucuronizada sin pasar por las etapas de oxidación y excretarse por la orina.

1.1.6. Variabilidad genética del gen *CYP2A6*.

Las enzimas de la familia CYP450 están involucradas en el metabolismo de sustancias endógenas y xenobióticos. Son las enzimas metabolizadoras de drogas más importantes de la fase I del metabolismo y tienen una gran variabilidad interindividual e interétnica en los niveles tisulares y actividad enzimática, esto puede dar lugar a diferencias en la toxicidad de muchas drogas y compuestos del medio ambiente. Se ha estimado que del 20 al 40% de la variabilidad interindividual en el metabolismo de drogas es atribuida a la existencia de variables genéticas en genes de citocromos (Ingelman-Sundberg *et al.* 2007). La enzima CYP2A6 (familia 2, subfamilia A, polipéptido 6), es una enzima monooxigenasa que metaboliza la nicotina y otros compuestos. Se expresa principalmente en el hígado, representa cerca 1–10% del total de los CYPs y solo se encuentran trazas en tejidos extra hepáticos como la mucosa nasal y las células del epitelio bronquial (Pelkonen *et al.* 2001). El gen *CYP2A6* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 19 entre 19q12 y 19q13.2, mide 6 kb, contiene 9 exones y codifica una proteína de 494 aminoácidos (McDonagh *et al.* 2012). *CYP2A6* y *CYP2A7* comparten un 96% de homología en la secuencia nucleotídica y 94% en la secuencia de aminoácidos (Raunio & Rahnasto-Rilla 2012).

El gen *CYP2A6* es altamente polimórfico y es responsable de la variación interindividual en el metabolismo de la nicotina, por lo que se le ha asociado con comportamientos de adicción al tabaco. Las variantes genéticas tienen diferente grado de impacto en la función de CYP2A6. Algunas resultan en la pérdida completa de la función, reducción ó incremento en la actividad enzimática (Tanner *et al.* 2015). Los genotipos de *CYP2A6* determinan fenotipos funcionales que describen el efecto de las variantes en la actividad enzimática. Por ejemplo, los metabolizadores pobres (alelos de *CYP2A6* inactivos, homocigotos para alelos inactivos), los lentos (un alelo inactivo o dos alelos de actividad disminuida), los intermedios (heterocigoto con un alelo de actividad disminuida y un alelo activo), los normales (2 alelos activos) ó los ultrarápidos (más de dos alelos activos) (McDonagh, *et al.* 2012).

Es de esperarse que las personas que metabolizan la nicotina más rápidamente consuman más cigarrillos al día en comparación con los metabolizadores lentos. Además, los

metabolizadores lentos parecen ser menos dependientes a la nicotina, pues a medida que incrementa la edad, es frecuente que este grupo abandone el hábito de fumar (Benowitz 2009).

En una población de fumadores asiáticos y caucásicos, el metabolismo de la nicotina se evaluó mediante una infusión intravenosa de nicotina marcada con deuterio y se correlacionó positivamente con el número de cigarrillos fumados al día y el consumo de nicotina por cigarrillo, apoyando la hipótesis de que el aclaramiento del alcaloide influye en el hábito de fumar. Las variaciones genéticas de *CYP2A6* también pueden influir en el riesgo de cáncer inducido por el hábito de fumar, por el mecanismo de síntesis de NNK. La NNK se activa a través de *CYP2A6* y otras enzimas de la familia CYP450 y consecuentemente, es de esperarse los fumadores que tienen actividad enzimática lenta de CYPs consuman menos cigarrillos y activen menos NNK, en comparación con un metabolizador normal, disminuyendo el riesgo de cáncer (Benowitz 2009).

Por lo tanto se puede plantear la hipótesis de que los individuos que son metabolizadores lentos o pobres pueden tener un menor riesgo de dependencia al tabaco, cantidad de cigarrillos fumados por día, una mayor probabilidad de dejar de fumar y menor riesgo de enfermedades provocadas por el tabaquismo (Xu *et al.* 2002).

1.1.6.1. Variantes de *CYP2A6* relacionadas al metabolismo de la nicotina y derivados.

1.1.6.1.1. *CYP2A612.**

CYP2A6 tiene más de 35 variantes alélicas. La variante *CYP2A6**12 fue reportada por Oscarson y colaboradores en 1999. Esta variante es resultado de una translocación entre los genes *CYP2A6* y *CYP2A7* que genera el híbrido *CYP2A6/CYP2A7* formado por los exones 1-2 del gen *CYP2A7* y los exones 3-9 del gen *CYP2A6* (Figura 5), esto causa la pérdida de 10 aminoácidos y la actividad reducida de *CYP2A6* (Oscarson *et al.* 2002). Las frecuencias de las variantes del gen *CYP2A6* son bajas en caucásicos y americanos pero altas en asiáticos (Tanner *et al.* 2015).

1.1.6.1.2. *CYP2A6*1D*.

La variante *CYP2A6*1D* consiste en el cambio de A>G en la región -1,013 río arriba del gen y cae dentro del promotor. Este cambio reduce significativamente en la expresión de *CYP2A6* a un 48% en comparación con el alelo silvestre (A). Se ha propuesto que la secuencia entre -1,019 y -1,005 abarca un elemento potenciador que probablemente reduce la capacidad de unión de algún factor de transcripción (Pitarque *et al.* 2004). Se ha identificado una frecuencia alta de esta variante en la población caucásica (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Las variantes *CYP2A6*12* y *CYP2A6*1D* no han sido estudiadas en la población mexicana. La distribución de estos alelos podrían ser útiles en estudios relacionados con el hábito de fumar, aclaramiento de la nicotina y la incidencia de cáncer de pulmón u otros tipos de cáncer en los fumadores.

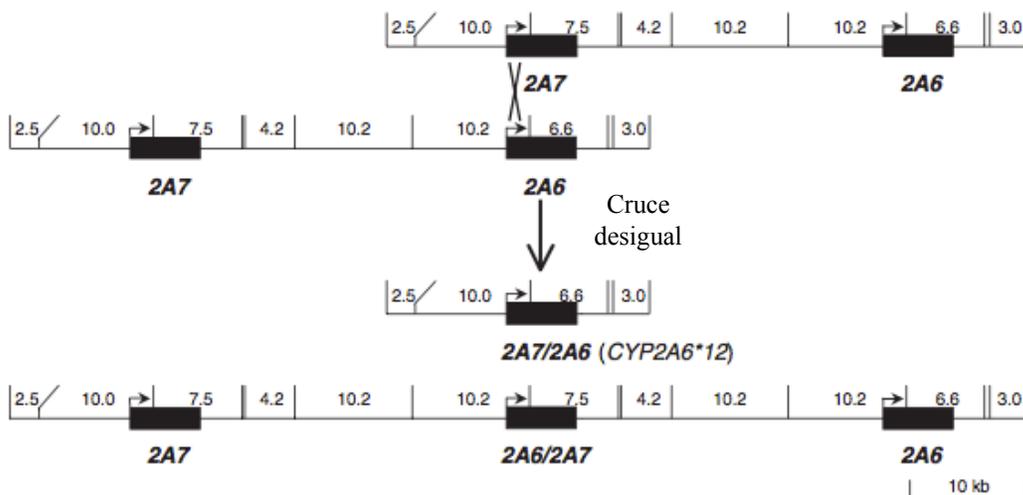


Figura 5. Variante *CYP2A6*12*. Cruce de *CYP2A6/CYP2A7* propuesto para la generación de *CYP2A6*12* (Oscarson *et al.* 2002).

1.1.7. Polipéptidos transportadores aniónicos orgánicos (OATPs).

Los OATPs son glicoproteínas de 12 dominios transmembrana que pertenecen a la superfamilia de los transportadores de solutos orgánicos aniónicos (*SLCO*). Se expresan principalmente en las células del túbulo renal proximal en los riñones y en casi todas las barreras epiteliales del cuerpo, así como el endotelio y otros tejidos. Su función es mediar

el transporte de Na^+ y de una variedad de moléculas principalmente compuestos orgánicos anfipáticos como sales biliares, hormonas y sus conjugados, toxinas y varias drogas. Están clasificados en familias de forma similar a la familia de CYP450. Los OATPs similares en más del 40% de su secuencia de aminoácidos son agrupados en la misma familia (OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP5 y OATP6), mientras que las proteínas con más del 60% de similitud son clasificadas dentro de subfamilias (OATP1A, OATP1B u OATP1C). La familia OATP3 contiene un miembro, OATP3A1. Previos estudios mostraron que el ortólogo de OATP3A1 se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de rata y sus variantes pueden estar relacionadas con comportamientos adictivos (Hagenbuch & Gui 2008, Wang *et al.* 2012). Su función es muy importante en la farmacocinética, especialmente en el transporte de drogas transmembrana en varios tejidos, principalmente en el riñón, para la excreción por la orina. Además la expresión alterada de OATP3A1 está reportada en varios tipos de cáncer (Tamai *et al.* 2014, Thakkar *et al.* 2015).

OATP1 y OATP3 están localizados en la membrana basolateral de las células del túbulo proximal. Estos actúan transportando aniones orgánicos a través de la membrana basolateral y en la célula a través de iones dicarboxilatos. La energía es proporcionada por $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPasa, que mantiene un gradiente de Na^+ dirigida hacia el interior de la célula. Este gradiente impulsa al cotransportador de Na^+ /dicarboxilato para mantener un gradiente de dicarboxilato hacia el exterior de la célula que es necesario para que el OATP1 y OATP3 intercambien los sustratos aniónicos (El-Sheikh *et al.* 2008, Nigam *et al.* 2015) (Figura 6).

Las variantes génicas en estos receptores pueden asociarse con alteraciones en el manejo o metabolismo de drogas. Por ejemplo, la baja frecuencia de la variante Ile305Phe en OATP3 afecta el manejo con el antibiótico cefalosporina en asiáticos por una menor actividad del transportador (Yee *et al.* 2013). Wang y colaboradores estudiaron la vulnerabilidad de la adicción a la nicotina mediante un meta-análisis de estudios de GWAS y encontraron que el SNP rs7163369 localizado en 15q26 dentro del gen *SLCO3A1* está asociado con esta adicción (Wang *et al.* 2012, Wei *et al.* 2014). La variante 882G>C del gen *SLCO3A1* (rs1517618) causa un cambio de aminoácido de glutamato a aspartato (E294D) que podría

alterar la excreción de nicotina, pero esta hipótesis aun no ha sido estudiada y este alelo se encuentra en la población méxico-americana con una frecuencia de 0.113 (Montasser *et al*, 2010).

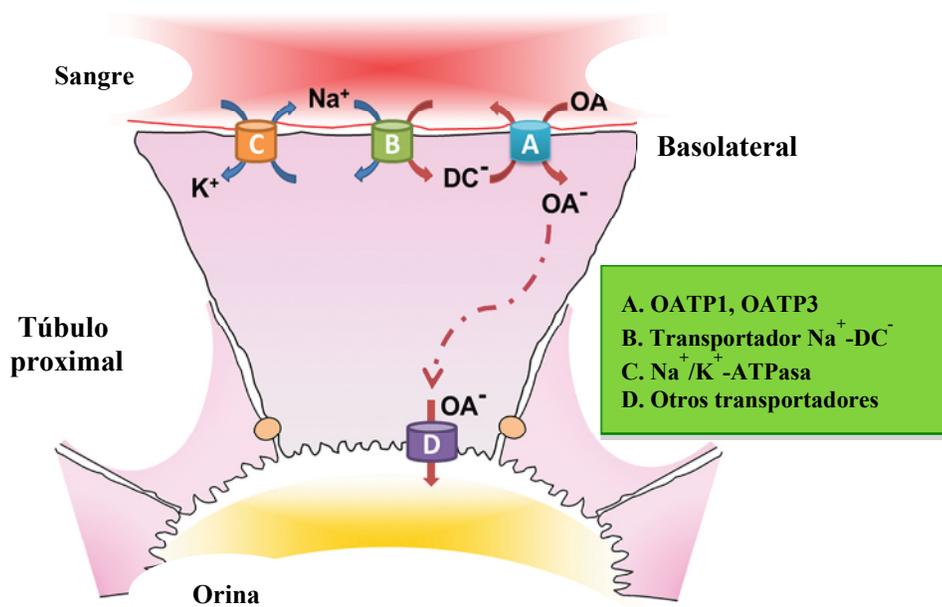


Figura 6. Mecanismo de transporte de aniones orgánicos en el túbulo proximal. La $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ se encarga de mantener un gradiente de sodio en el interior de la célula. Este gradiente impulsa al cotranspotador de $\text{Na}^+ / \text{dicarboxilato}$ para mantener un gradiente de dicarboxilato hacia el exterior de la célula. El gradiente $\text{Na}^+ / \text{dicarboxilato}$ es necesario para que los OATP1 y OATP3 intercambien los sustratos aniónicos (Nigam *et al.* 2015).

1.2. Justificación.

El tabaquismo es la principal causa de carcinoma pulmonar, EPOC, enfermedades cardiovasculares, etc. El consumo de cigarrillos es común entre los adolescentes y la nicotina es el agente causal de la adicción al tabaco. Varios estudios indican que la velocidad de la eliminación de la nicotina y la sensibilidad de los receptores de acetilcolina nicotínicos está relacionada con la dependencia al cigarrillo.

Este estudio pretende analizar asociaciones entre los niveles plasmáticos de cotinina y variantes genéticas en genes responsables del metabolismo de la nicotina en un grupo de estudiantes con diferentes niveles de exposición al tabaco. Este estudio posiblemente sentará las bases para estudios futuros sobre variantes genéticas asociadas al metabolismo de la nicotina y sus derivados y afecciones relacionadas. Estos conocimientos podrían facilitar el entendimiento de los factores genéticos involucrados en la dependencia a la nicotina y la relación de la obesidad con la supresión del hábito de fumar y permitirían definir poblaciones en riesgo de tabaquismo.

1.3. HIPÓTESIS

Asociación del hábito de fumar vs cotinina

- H₀: el hábito de fumar no se asocia con las concentraciones plasmáticas de cotinina.
- H₁: el hábito de fumar se asocia con las concentraciones plasmáticas de cotinina.

Asociación de cigarrillos/día (CPD) vs cotinina

- H₀: el número de CPD no se asocian con las concentraciones plasmáticas de cotinina.
- H₁: el número de CPD se asocian con las concentraciones plasmáticas de cotinina.

Asociación de las variantes vs hábito de fumar

- H₀: las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) no se asocian, con diferencias en los hábitos de fumar.
- H₁: alguna(s) de las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) se asocian con hábitos de fumar.

Asociación de las variantes vs cotinina

- H₀: las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) no se asocian con diferencias en las concentraciones de cotinina plasmática.
- H₁: alguna(s) de las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) se asocian con las concentraciones plasmáticas de cotinina.

Asociación de la variante *CHRNA5* vs CPD

- H₀: la variante rs16969968 no se asocia con diferencias en el número de CPD.
- H₁: la variante rs16969968 se asocia con diferencias en el número de CPD.

Asociación de las variantes vs IMC

- H_0 : las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) no se asocian con el IMC.

H_1 : alguna(s) de las variantes de los genes *CYP2A6* (*CYP2A6*1D* y *CYP2A6*12*), *SCLO3A1* (rs1517618) y *CHRNA5* (rs16969968) se asocian con el IMC.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Realizar estudios de asociación entre las variaciones en hábitos de tabaquismo, las concentraciones plasmáticas de cotinina y el incremento del IMC con las variantes de genes responsables del metabolismo de la nicotina en jóvenes universitarios fumadores y no fumadores

2.2. Objetivos específicos.

1. Definir las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes en los genes seleccionados y el equilibrio de Hardy Weinberg (EHW).
2. Establecer si existe una correlación entre los niveles plasmáticos de cotinina y la exposición al humo del cigarrillo en jóvenes fumadores y no fumadores.
3. Establecer asociaciones entre la exposición al humo del cigarrillo (por encuesta), la concentración plasmática de cotinina (rasgo bioquímico) y variantes en los genes responsables del metabolismo de la nicotina en jóvenes fumadores y no fumadores.
4. Establecer asociaciones entre el hábito de fumar, el IMC y las variantes en los genes responsables del metabolismo de la nicotina en jóvenes fumadores y no fumadores.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos.

Para las extracciones de ADN se utilizó la técnica de TSNT, la cual emplea un buffer de lisis compuesto por 2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), 1% de SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), 100mM de NaCl (Amresco, Solon OH), 10mM de Tris-HCl pH = 8.0 (Amresco, Solon OH). También se utilizó fenol saturado (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), Sevag (compuesto por cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis MO): alcohol isoamílico (Amresco, Solon OH) 24:1) etanol e isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

Para las reacciones de PCR se utilizó el GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison WI), los primers fueron sintetizados en la casa comercial IDT (Coralville, IA), y se utilizó agarosa (Amresco, Solon OH) y bromuro de etidio (Promega, Madison WI) para visualizar las bandas. Se utilizaron las enzimas *MspI*, *BsrDI*, *BsaI*, *PstI*, *DraI*, *BsmAI*, *TaqI*, *BanII* y *SfcI* (New England BioLabs®, Ipswich, RU) para las reacciones de restricción.

Para la determinación de la concentración de cotinina plasmática se utilizó el estuche comercial de Calbiotech (Spring Valley, CA). Las muestras con alta concentración de cotinina fueron diluidas con albúmina sérica bovina (fracción V) al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

Entre otros reactivos utilizados se encuentran: hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), ácido bórico (Amresco), EDTA disodio dihidratado. También se utilizaron materiales de Corning y Costar (Costar City NY) tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, 2 mL y puntas para micropipetas de 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L.

3.2. ESTRATEGIA GENERAL.

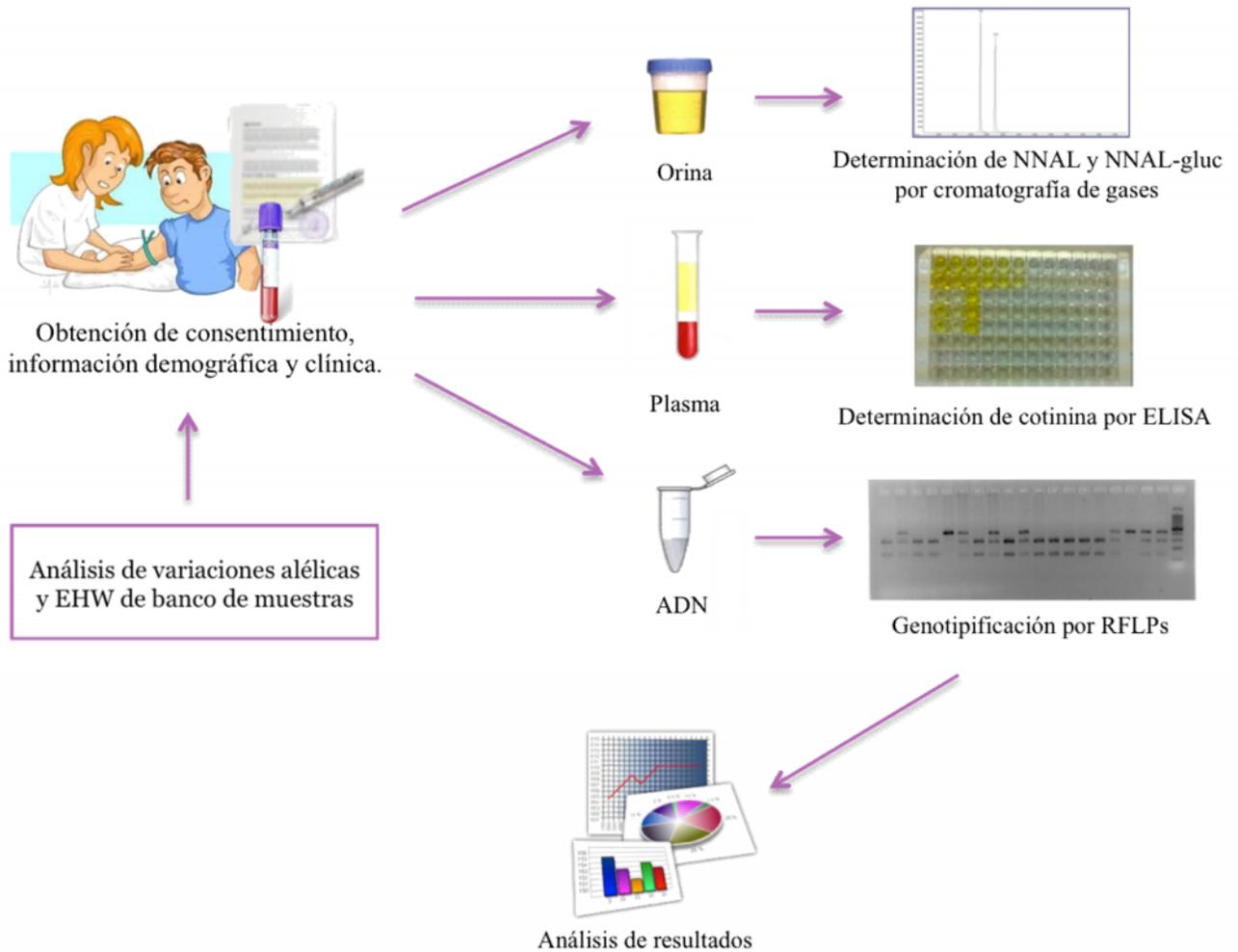


Figura 7. Estrategia general. Primeramente se definió el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y número muestral para algunas variantes de CYPs y GSTP1 mediante la estimación de las frecuencias alélicas. Después se inició con la toma de muestras de sangre y orina de jóvenes fumadores y no fumadores de diferentes facultades de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El plasma fue utilizado para la cuantificación de cotinina. También se extrajo el ADN para la genotipificación de las muestras y por último se realizaron los análisis estadísticos apropiados. Las muestras de orina serán utilizadas para estudios posteriores sobre el metabolismo de NNAL.

3.3. Métodos.

3.3.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes en los genes seleccionados y EHW para el cálculo del número muestral.

3.3.1.1. Sujetos de estudio.

Se seleccionaron 100 muestras de un banco de ADN del protocolo con título “Estudios Genéticos de los Tumores Intestinales Hereditarios Comunes en la Península Ibérica y las Américas”, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número BI10-003, el cual se encuentra almacenado en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Las muestras se seleccionaron con base en la edad (de 18 a 35 años), procedencia (del estado de Nuevo León), que fueran sujetos sanos no fumadores y adicionalmente se seleccionaron 12 sujetos fumadores para el cálculo del número muestral.

3.3.1.2. Genotipificación.

Las muestras fueron genotipificadas para algunas variantes en enzimas responsables del metabolismo de nicotina, NNAL y de HAPs. Primeramente se amplificó un fragmento de ADN por PCR y posteriormente se realizaron reacciones de restricción con la enzima correspondiente para identificar la variante. Se utilizaron 100 ng de ADN, GoTaq Green Master Mix de Promega y 50 μ M de los primers. Los programas de PCR para todas las variantes analizadas fueron similares y solo variaron en la temperatura y tiempo de alineamiento. Los programas iniciaron con desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 59-64°C por 30 segundos-1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y posteriormente una extensión final a 72°C por 10 minutos. Las variantes analizadas, primers, temperatura y tiempo de alineamiento, tamaño de amplicón, enzima para reacción de restricción y fragmentos esperados para cada SNP se encuentran en la Tabla 1. Los productos de PCR y los fragmentos de restricción fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

3.3.2. Recolección de muestras de sujetos jóvenes fumadores y no fumadores de distintas facultades de la UANL.

El protocolo para la toma de muestras de 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 BI12-005 y se respetaron las normas éticas de la Declaración de Helsinki 2008. Los criterios de inclusión de los participantes del estudio fueron los siguientes: ser mayor de 18 años de edad y menor de 35, fumadores y no fumadores y que aceptaran participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron que los jóvenes padecieran enfermedad pulmonar, hepática ó renal, el embarazo y que usaran otros productos que contuvieran nicotina, además de los cigarrillos. Como criterios de eliminación se consideraron un mal estado de la muestra o muestra insuficiente. Se reclutaron 475 estudiantes voluntarios de 18 a 35 años de edad de diferentes facultades de la Universidad Autónoma de Nuevo León entre mayo del 2013 y mayo del 2014. Los participantes firmaron un consentimiento informado, contestaron una encuesta acerca de la exposición al humo del cigarrillo, características socio-demográficas (encuesta en Anexo 1), se les tomó una muestra de aproximadamente 10 mL de sangre venosa anticoagulada con EDTA y entregaron 10 a 50 mL de orina. Las encuestas y consentimientos informados fueron almacenadas en la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) de la Facultad de Medicina y los datos de la encuesta se organizaron en una base de datos. Las muestras de sangre fueron trasladadas al Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en donde se separó el plasma y se almacenó a -70°C , se realizó extracción de ADN a partir de leucocitos con la técnica de TSNT (Anexo 2) y se almacenaron a -20°C . Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas utilizando Nanodrop 2000 Thermo Scientific (Waltham, MA) y se verificó la calidad del ADN con la relación 260/280.

3.3.3. Cuantificación de cotinina en plasma.

La cuantificación de cotinina se realizó por el método de ELISA de tipo competitivo con el estuche comercial de Calbiotech, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las muestras de plasma y los estándares se añadieron a pocillos, los cuales están recubiertos con anticuerpos anti-cotinina, y después se añadió la cotinina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). La cotinina de las muestras y estándares compiten con la cotinina conjugada

con HRP por los sitios de unión de los anticuerpos adheridos al pocillo. Posteriormente se hicieron lavados para eliminar la cotinina que no se unió a los anticuerpos, se añadió el sustrato y después de 30 minutos se agregó una solución de detención. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm en el lector de placas Multiskan FC Microplate de la marca Thermo Scientific, el cual permite lecturas de 0 a 3 DO con exactitud. La intensidad del color resultante es inversamente proporcional a la concentración de cotinina en las muestras y estándares. Con los datos obtenidos de DO de los estándares, se construyó una curva estándar y con ésta se calcularon las concentraciones de cotinina en las muestras de plasma. Los estándares fueron proporcionados por la casa comercial Calbiotech con concentraciones de 0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/mL. Se calculó la precisión de acuerdo a lo establecido por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (coeficiente de variación = [desviación estándar/media] x 100).

3.3.4. Genotipificación de *CHRNA5* (rs16969968), *SCLO3A1* (rs1517618), *CYP2A6*1D* (rs4803381) y *CYP2A6*12*.

La genotipificación de rs16969968 de *CHRNA5*, rs1517618 de *SCLO3A1* y *CYP2A6*1D* se realizó por los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés) y la genotipificación de *CYP2A6*12* se realizó mediante una PCR anidada.

3.3.4.1 *CHRNA5* (rs16969968).

Se utilizó la técnica de RFLP siguiendo el método de Bierut y colaboradores (Bierut *et al.* 2008). Se utilizaron 100 ng de ADN, GoTaq Green Master Mix de Promega, 50 µM de los primers *CHRNA5-F* (5'-CGCCTTTGGTCCGCAAGATA-3') y *CHRNA5-R* (5'-TGCTGATGGGGGAAGTGGAG-3') en un volumen final de 10 µL para amplificar un fragmento de 435 pb. El programa de PCR inició con desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización 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 minutos. 5 µL 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.

3.3.4.2 *SCLO3A1* (rs1517618).

Se utilizó la técnica de RFLP para identificar la mutación 882C>G en el gen *SCLO3A1*. Se utilizaron 100 ng de ADN, GoTaq Green Master Mix de Promega, 50 µM de los primers SCLO3A1-F (5'-TTATTCTGCCTCCACCAAGTC-3') y SCLO3A1-R (5'-CGGTGCCTTACTCTTCTTCTC-3') en un volumen final de 10 µL para amplificar un fragmento de 314 pb. El programa de PCR inició con desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización 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 minutos. 5 µL del producto de PCR se digirieron con la enzima *BanII* durante toda la noche a 37°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 882C>G, resulta en un cambio de aminoácido de E294D, que genera un sitio de restricción para la enzima *BanII* y produce fragmentos de restricción de 246 pb y 68 pb (homocigoto GG), el alelo silvestre C no genera fragmentos de restricción y se observa un fragmento de 314 pb (homocigotos CC) y los heterocigotos CG generan 3 fragmentos de 314 pb, 246 pb y 68 pb.

3.3.4.3 *CYP2A6*1D* (rs4803381).

De la misma manera se utilizó la técnica de RFLP para identificar esta variante. Se utilizaron 100 ng de ADN, GoTaq Green Master Mix de Promega, 50 µM de los primers CYP2A6*1D-F (5'-CAACCCCAAATGGTGGAAA-3') y CYP2A6*1D-R (5'-CCCTGACAAAGCAGGAATCAT-3') en un volumen final de 10 µL para amplificar un fragmento de 346 pb. El programa de PCR inició con desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización 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 minutos. 5 µL del producto de PCR se digirieron con la enzima *SfcI* durante toda la noche a 37°C. Los productos de PCR y los fragmentos de digestión fueron observados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. El SNP -1013A>G se

encuentra en el promotor del gen *CYP2A6*. El cambio de nucleótido resulta en la generación de un sitio de restricción para la enzima *SfcI* y produce fragmentos de restricción de 197 pb y 149 pb (homocigoto AA). El alelo silvestre G no genera fragmentos de restricción y se observa un fragmento de 346 pb (homocigotos GG) y los heterocigotos CG generan 3 fragmentos de 346 pb, 197 pb y 149 pb.

3.3.4.4. *CYP2A6*12*.

La genotipificación de *CYP2A6*12* se desarrolló mediante el método descrito por Oscarson y colaboradores (Oscarson *et al.* 2002) 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 minuto, 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 minutos. 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'-CGCTCCCCGTTGCTGAATA-3') en un volumen final de 10 μ L. El programa de PCR inició con una desnaturalización a 95°C por 1 minuto, 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 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos. 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.

3.3.5. Análisis estadístico.

Debido a la falta de algunos datos de IMC de los participantes del estudio, se realizó un análisis del patrón de datos faltantes con el cual se confirmó que la selección de los datos cumple con criterios de aleatoriedad (MCAR, P valor para prueba de Little = 0.359; IBM SPSS 19), de manera que se omitieron en cada análisis solamente los valores faltantes en las variables comparadas. Se determinaron los descriptivos de 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 con homocedasticidad o pruebas de Welch en su ausencia, y pruebas de cociente de verosimilitudes para variables categóricas. Además se ajustaron modelos de regresión múltiple para cada variable continua con género y tabaquismo como variables independientes. Se utilizó la prueba U de Mann Whitney para analizar la asociación de la concentración de cotinina con el hábito de fumar, género e IMC. Para el análisis de asociación de la concentración de cotinina plasmática y los genotipos se utilizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para las variables con 3 categorías y una prueba t para las variables con 2 categorías. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrada (X^2) para evaluar el equilibrio de EHW, las asociaciones entre genotipos, fenotipos y el IMC, éste último agrupado de acuerdo a los estándares de la OMS en bajo a normal ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($> 25 - < 30 \text{ kg/m}^2$) y obesidad ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$). Los valores de P menores de 0.05 fueron definidos como estadísticamente significativos. Estos análisis fueron realizados en los programas JMP-SW 12, SPSS, XLSTAT 2015.2.02 y Excel.

Gen	Variante	Primers	Alineamiento	Amplicón	Enzima	Restricción
CYP1A1	M1 CYP1A13204T>C	F 5' GGCTGAGCAATCTGACCCTA 3' R 5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'	62°C - 1 min	900 pb	M1: <i>MspI</i>	M1: Wt: 900pb M1: Var: 693pb y 206pb
	M2 CYP1A1 2454A>G (I462V) M4 CYP1A1 2452C>A (T461N)	F 5' CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC 3' R 5' TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC 3'	62°C - 1 min	204 pb	M2: <i>BsrDI</i> M4: <i>BsaI</i>	M2: Wt: 140pb y 55pb M2: Var: 204pb M4: Wt: 139pb y 65pb M4: Var: 203pb
CYP2E1	21293G>C	F 5' CCAGTCGAGTCTACATTGTCA 3' R 5' TTCATTCTGTCTTCTAACTGG 3'	60°C - 30 seg	413 pb	<i>PstI</i>	Wt: 413pb Var: 290pb y 120pb
	21053C>T	F 5' TCGTCAGTTCTGAAAGCAGG 3' R 5' GAGCTCTGATGGAAGTATCGCA 3'	64°C - 30 seg	998 pb	<i>DraI</i>	Wt: 572pb, 302pb y 121pb Var: 874pb y 121pb
GSTP1	1375A>G (I105V)	F 5' GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG 3' R 5' AGCCACCTGAGGGGTAAG 3'	60°C - 30 seg	433 pb	<i>BsmAI</i>	Wt: 328 bp y 105 bp Var: 222pb, 106pb, y 105pb

Tabla 1. Lista de variantes analizadas y condiciones de análisis para el cálculo de equilibrio de Hardy Weinberg y frecuencias alélicas y genóticas de 100 muestras de ADN de sujetos sanos extraídas de un banco de muestras.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes en los genes seleccionados y el equilibrio de Hardy Weinberg en sujetos de noreste de México.

Se genotipificaron algunos genes de enzimas de la familia *CYP450* y transferasas que intervienen en el metabolismo de xenobióticos como NNAL y de HAPs de 100 muestras de ADN de sujetos jóvenes de 18 a 35 años de edad, sanos y no fumadores, que fueron seleccionados de un banco de ADN (del proyecto con número de registro BI10-003) del Laboratorio de Terapia Génica. Se utilizaron las condiciones antes mencionadas y se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, la frecuencia del alelo menor (FAM) y el equilibrio de EHW, tomando una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa (Tabla 2).

Polimorfismos (silvestre/variante)	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia homocigotos silvestres	Frecuencia heterocigotos	Frecuencia homocigotos mutantes	FAM	EHW (P)
<i>CYP1A1</i>							
M1 (T/A) rs4646903	0.53	0.47	0.31	0.44	0.25	0.47	0.24
M2 (A/G) rs1048943	0.45	0.55	0.32	0.25	0.43	0.45	1×10^{-5}
M4 (C/A) rs1799814	0.97	0.03	0.94	0.06	0.0	0.03	0.75
<i>CYP2E1</i>							
<i>PstI</i> (G/C) rs3813867	0.83	0.17	0.71	0.25	0.04	0.17	0.35
<i>DraI</i> (T/A) rs2031920	0.84	0.16	0.74	0.20	0.06	0.16	0.01
<i>GSTP1</i> (A/G) rs1695	0.46	0.54	0.21	0.51	0.28	0.46	0.8

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas y EHW de algunas variantes en genes de la familia *CYP450* y *GSTP1* en sujetos sanos no fumadores.

Las distribuciones genotípicas de las variantes estudiadas fueron consistentes con el EHW, con excepción de M2 de *CYP1A1* y *CYP2E1-DraI*. Las FAM indican que los marcadores

CYP1A1(M1), *CYP2E1-Pst1* y *GSTP1* son variantes comunes en la población y que el alelo A de *CYP1A1*(M4) es una variante rara.

Se realizaron los mismos estudios en una pequeña población de 12 sujetos con las mismas características pero en este caso fumadores (Tabla 3) con el fin de determinar el número de muestra con los datos de sujetos fumadores y no fumadores.

Polimorfismos (silvestre/variante)	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia homocigotos silvestres	Frecuencia heterocigotos	Frecuencia homocigotos mutantes	FAM
<i>CYP1A1</i>						
M1 (T/A) rs4646903	0.64	0.36	0.27	0.73	0.0	0.36
M2 (A/G) rs1048943	0.91	0.09	0.82	0.18	0.0	0.09
M4 (C/A) rs1799814	1	0	0.94	0.0	0.0	0.0
<i>CYP2E1</i>						
<i>PstI</i> (G/C) rs3813867	0.87	0.13	0.82	0.09	0.09	0.13
<i>DraI</i> (T/A) rs2031920	0.91	0.09	0.91	0.0	0.09	0.09
<i>GSTP1</i> (A/G) rs1695	0.5	0.5	0.18	0.64	0.18	0.5

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de algunas variantes en genes de la familia *CYP450* y *GSTP1* en sujetos sanos fumadores (en este caso no se calculó el EHW debido al bajo número de muestra n=12).

4.1.1. Cálculo del número muestral para cada variante.

Se utilizó la fórmula: $n = Z\alpha, 2^2 * p * (1-p) / (\delta^2)$, donde $\alpha = 5$, δ = diferencia de frecuencias alélicas entre fumadores y no fumadores, $z = 1.960$, α 2 direcciones = 0.050 y $\beta = 0.8$. El número de muestra para las variantes de *CYP1A1* M1 fue de 45, para M2 fue de 11, para M4 fue de 166; para las variantes de *CYP2E1-PstI* fue de 124, *DraI* fue de 71 y para la variante de *GSTP1* fue de 124. Estos datos serán utilizados para estudios posteriores referentes al análisis del metabolismo de NNAL y HAPs en fumadores y no fumadores.

4.1.2. Análisis de comparación de frecuencias genotípicas de diferentes poblaciones.

Adicionalmente se compararon a las frecuencias estudiadas en esta población con las reportadas en otras poblaciones. Se puede observar que las frecuencias genotípicas de las variantes M4 de *CYP1A1*, *CYP2E1-PstI* y *GSTP1* son similares a las encontradas en las poblaciones; las frecuencias genotípicas de la variante M1 de *CYP1A1* son similares en las poblaciones de asiáticos, México-americanos y la población del noreste de México. Las frecuencias genotípicas de las variantes *CYP2E1-DraI* son similares con excepción de la población asiática y las frecuencias genotípicas de la variante M2 de *CYP1A1* son diferentes en las poblaciones estudiadas (Figura 8).

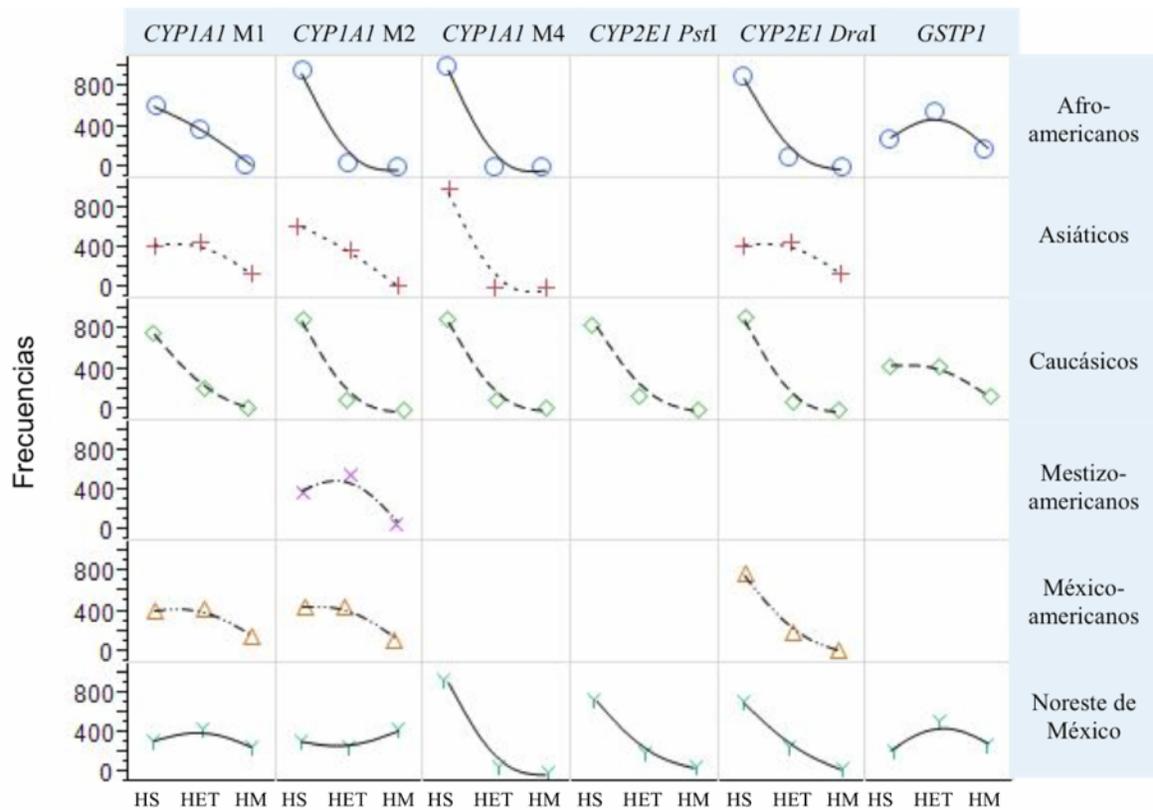


Figura 8. Comparación de frecuencias genotípicas de diferentes poblaciones con la población del Noreste de México analizada en este estudio. HS: homocigoto silvestre; HET: heterocigoto; HM: homocigoto mutado.

4.2. Análisis de variantes demográficas de jóvenes fumadores y no fumadores participantes del estudio.

Se reclutaron un total de 475 muestras de jóvenes fumadores y no fumadores, de los cuales el 79.37% era originario del estado de Nuevo León. 211 (44.42%) fueron fumadores y 264 (55.58%) no fumadores. De los fumadores, 133 (53.55%) fueron hombres y 78 (36.95%) mujeres con diferencia significativa de $P < 0.05$ (Figura 9). Del total de los fumadores, 133 (63.03%) dijeron fumar diariamente.

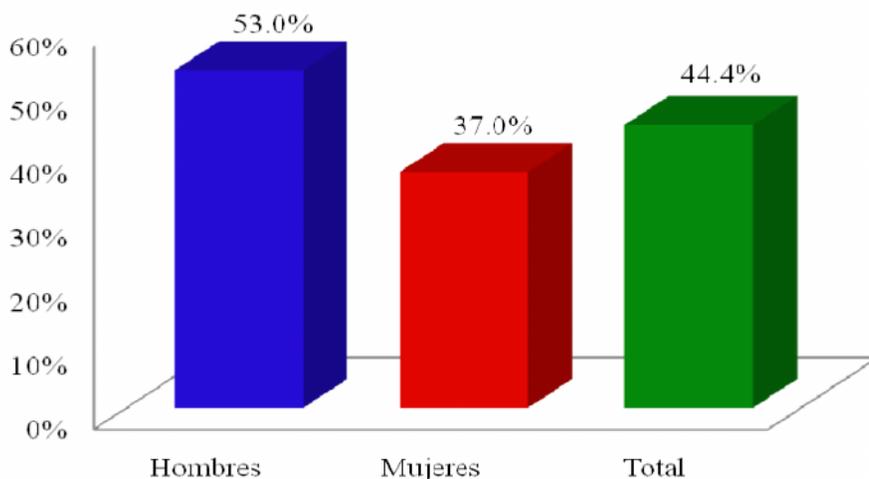


Figura 9. Prevalencia del consumo activo de tabaco en sujetos de 18 a 35 años de edad.

La mayoría de los fumadores, el 31.8%, dijo fumar de 2 a 5 cigarrillos por día, seguido de los que fuman de 6 a 10 cigarrillos por día con un 17.1% (Figura 10). La media de las edades de total de la población estudiada fue de 20.05 y la desviación estándar de 3.78, la edad a la que la mayoría de los sujetos (20.6%) comenzaron a fumar fue a los 16 años y la edad a la que la mayoría (17.2%) de éstos comenzó a fumar diariamente, fue a los 18 años de edad. Esto quiere decir que los jóvenes tardan unos 2 años en comenzar a fumar diariamente desde el inicio del hábito (Figura 11).

En cuanto al consumo de alcohol a la semana, se observó que los fumadores consumen más alcohol que los no fumadores con $P = 0.006$ y que esto es independiente del género (Figura 12). No se encontraron diferencias con respecto a la actividad física en fumadores y no fumadores.

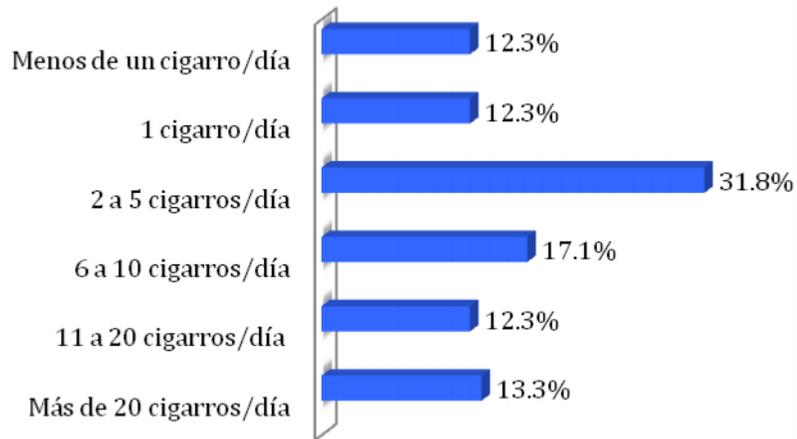


Figura 10. Consumo de CPD.

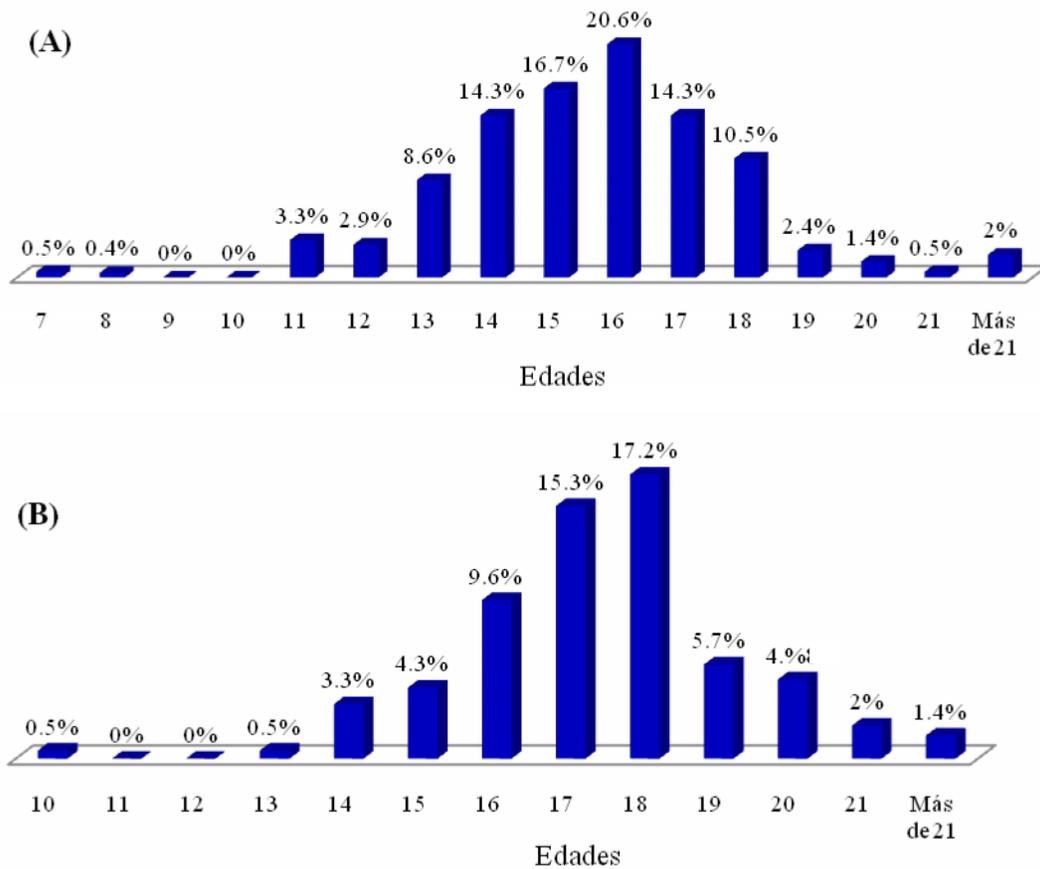


Figura 11. (A) Edad en la que fumaron por primera vez. (B) Edad a la que empezaron a fumar diariamente.

La media de IMC en los fumadores fue de 24.98 kg/m² (rangos: 15.61-46.51) y en los no fumadores de 24.08 kg/m² (rangos: 17.01-55.28). Se agruparon los datos de IMC en las categorías propuestas por la OMS (bajo a normal ≤ 25 kg/m², sobrepeso $> 25 - < 30$ kg/m² y obesidad ≥ 30 kg/m²) y se observó que los fumadores tienen un mayor porcentaje de sobrepeso (29.08%) y obesidad (12.24%) que los no fumadores (25% y 10.65% respectivamente) pero no se encontraron diferencias estadísticas ($P = 0.22$) (Figura 13). Para este análisis se eliminaron 20 no fumadores y 15 fumadores debido a la carencia de datos de peso y estatura. No se encontraron diferencias en la actividad física entre fumadores y no fumadores, tomando en cuenta como actividad física la dedicación de 90 minutos por semana; además, se observó una tendencia hacia un mayor consumo de frutas y verduras en no fumadores ($P = 0.06$).

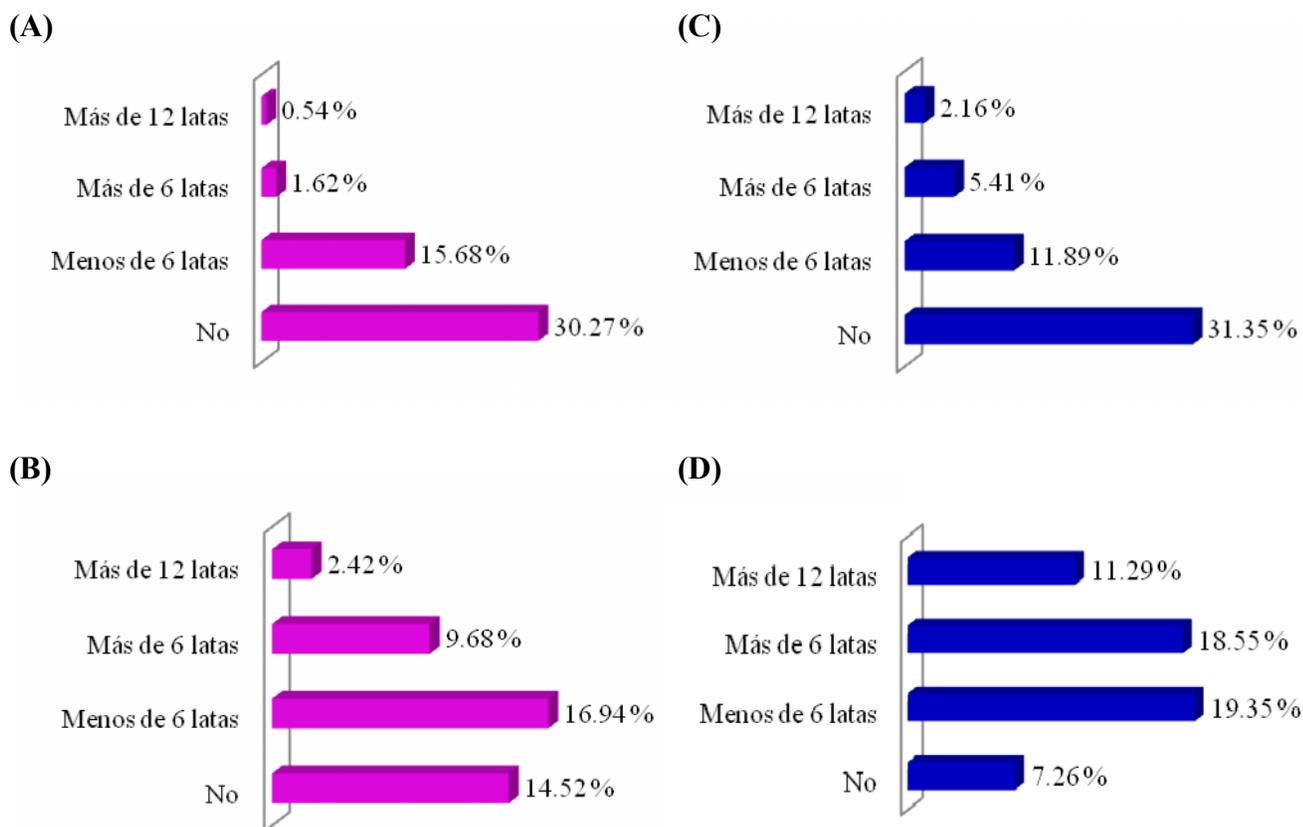


Figura 12. Consumo de alcohol en mujeres y hombres fumadores y no fumadores. (A) Consumo de alcohol en mujeres no fumadores. (B) Consumo de alcohol en mujeres fumadoras. (C) Consumo de alcohol en hombres no fumadores. (D) Consumo de alcohol en hombres fumadores.

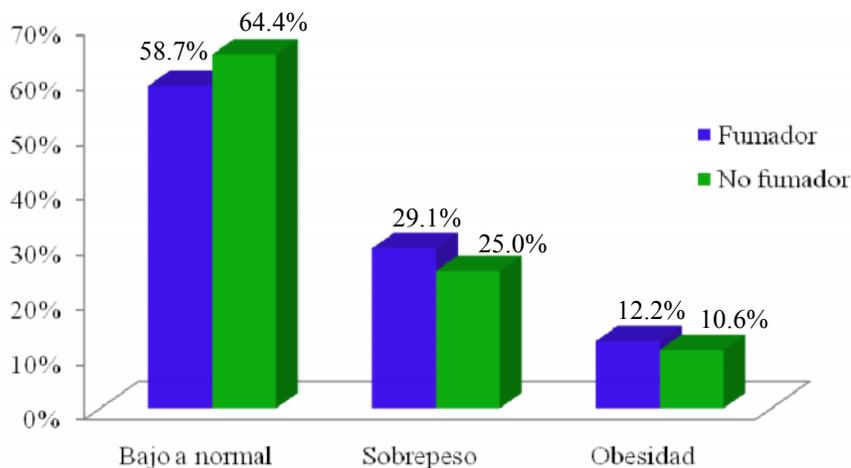


Figura 13. IMC bajo a normal, sobrepeso y obesidad en fumadores y no fumadores.

4.3. Análisis de cotinina plasmática en fumadores y no fumadores.

Se realizó el análisis de cotinina de 306 sujetos fumadores y no fumadores por el método de ELISA de tipo competitivo. Se realizó una curva de calibración con estándares de concentraciones desde 0 a 100 ng/mL proporcionados por la casa comercial. Se graficó el recíproco de las DO debido a que la DO es inversamente proporcional a la concentración y se calcularon las concentraciones de las muestras con la ecuación de la curva polinómica de tercer grado, tomando como el valor de "x" el recíproco de la DO (Figura 14). La precisión fue de 16.8% lo cual es aceptable cuando la concentración del analito se maneja en ppb (ng/mL). Según Quattrocchi y colaboradores se acepta una precisión del 45% cuando se manejan unidades de ppb (Quattrocchi et al. 1992). Se realizó también una curva estándar graficando el logaritmo base 10 de la DO vs el logaritmo base 10 de la concentración, descartando la concentración de 0 de la curva. Con ésta última se calcularon de nuevo las concentraciones de muestras y estándares. Se calculó el error relativo de los dos métodos de cálculo (curva logarítmica y polinómica de tercer grado) y se observó que error relativo es similar en los métodos de cálculo. Por lo tanto las dos curvas son útiles para el cálculo de concentración de cotinina, sin embargo no es posible calcular concentraciones menores a 5 ng/mL con la curva logarítmica.

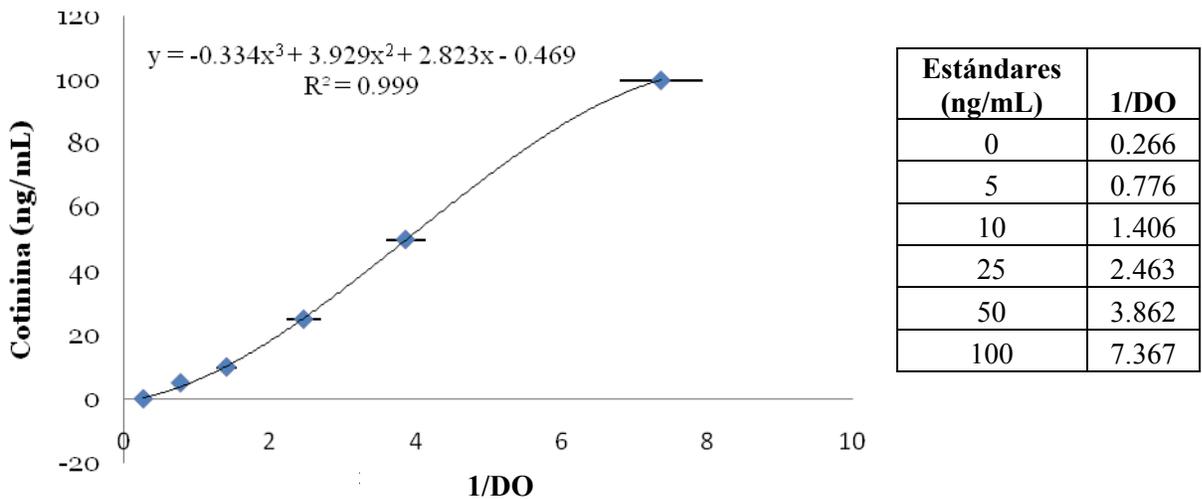
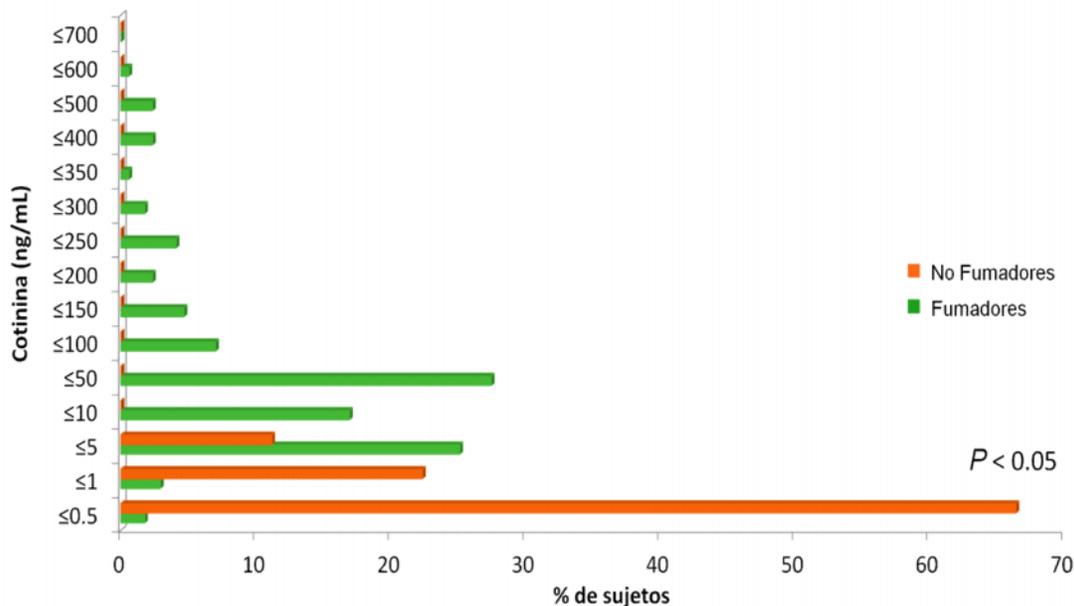


Figura 14. Curva estándar para el cálculo de concentración de cotinina plasmática. Se graficaron las concentraciones vs 1/DO, el resultado es una curva polinómica de tercer grado.

Los plasmas con concentraciones de más de 100 ng/mL de cotinina se diluyeron con BSA al 1%. La concentración de cotinina plasmática fue diferente entre fumadores y no fumadores y entre hombres y mujeres ($P < 0.05$). En los no fumadores la media de concentración de cotinina fue de 0.46 ng/mL y en fumadores de 13.82 ng/mL, los rangos en no fumadores fue de 0.14 a 2.81 ng/mL y en fumadores de 0.41 a 513.12 ng/mL (Figura 15).

Se graficó la concentración de cotinina y CPD durante las últimas 48 horas. No se encontró una correlación lineal entre la concentración de cotinina plasmática y los CPD debido a la variabilidad de las concentraciones de cotinina ($r^2 = 0.37675$) (Figura 16), sin embargo sí se encontraron diferencias estadísticas entre los CPD y la concentración de cotinina ($P < 0.05$). Se puede notar un aumento de la concentración de cotinina cuando se agrupan los datos en CPD (1 a 10, 11 a 20 y más de 20 CPD) y se observa que los que consumen más de 20 CPD tienen altas concentraciones de cotinina plasmática. No obstante, en el grupo

que fuma de 11 a 20 CPD se encuentran las mayores concentraciones de cotinina de hasta 513 ng/mL (Figura 17).



	No Fumadores	Fumadores	Cotina ng/mL		
Media	0.63	62.79	Media de rangos	P	
Mediana	0.46	13.82	Fumador	72.5	
Rango	0.14-2.81	0.41-513.12	No fumador	219.04	1.8 x 10 ⁻³
Desviación estándar	0.48	0.48	Mujeres	136.23	
			Hombres	160.52	1 x 10 ⁻³

Figura 15. Análisis de cotinina plasmática en fumadores y no fumadores.

Se realizó una curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) que es una representación gráfica de la sensibilidad frente a 1 – especificidad para determinar un punto de corte de acuerdo a la razón de verdaderos positivos y falsos positivos, valor con el cual se pueden discriminar casos positivos y negativos de acuerdo a la sensibilidad y especificidad seleccionada. El mejor método posible de predicción se situaría en un punto en la esquina superior izquierda, o coordenada (0,1) del espacio ROC, representando un 100% de sensibilidad (ningún falso negativo) y un

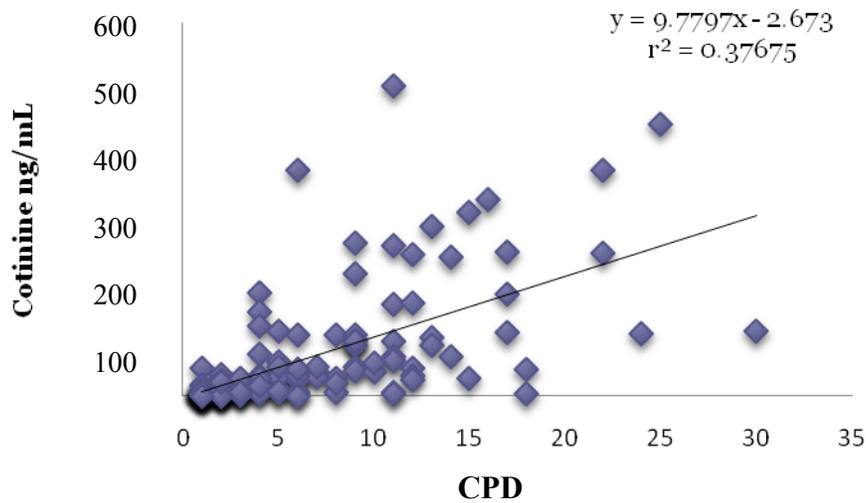


Figura 16. Concentración de cotinina plasmática (ng/mL) y CPD. No se observa correlación lineal.

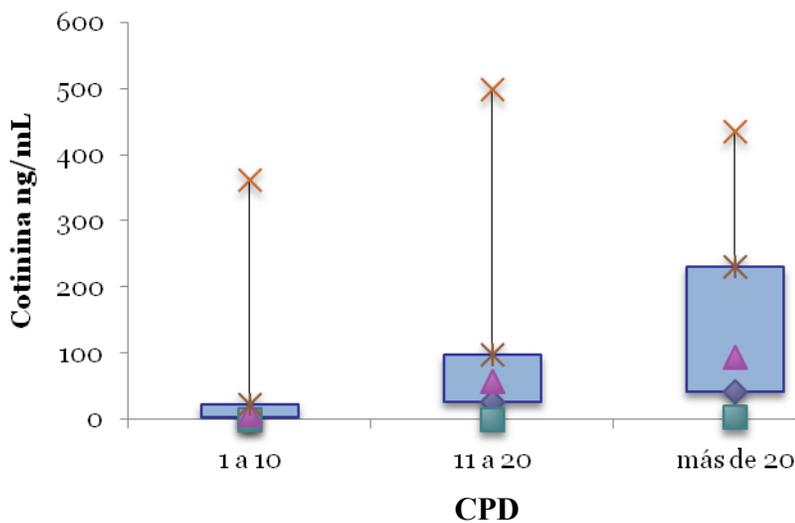
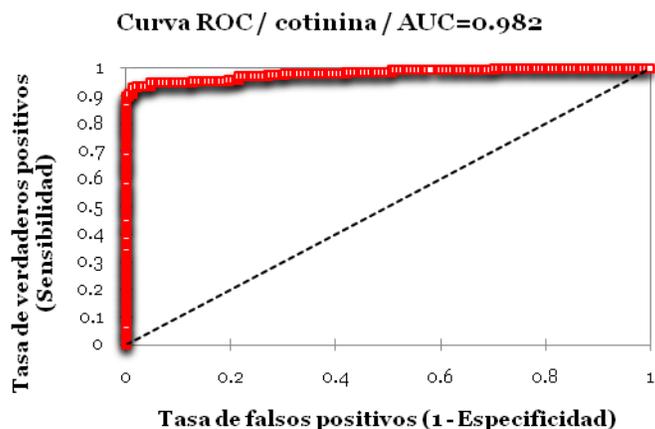


Figura 17. Concentración de cotinina plasmática (ng/mL) y CPD agrupados.

100% de especificidad (ningún falso positivo). Un parámetro para evaluar la bondad de la prueba es el área bajo la curva (AUC) que puede tomar valores entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminadora diagnóstica. Es decir, si la AUC para una prueba diagnóstica es 0,8 significa que existe un 80% de probabilidad de que el diagnóstico realizado sea correcto (Cerde & Cifuentes

2012). En el caso de la prueba de cotinina plasmática entre fumadores y no fumadores, se realizó la curva ROC utilizando el programa XLSTAT 2015.2.02. El AUC fue de 0.982 y se seleccionó el punto de corte de 2.85 con 16 falsos negativos, 0 falsos positivos, 90.48% de sensibilidad, 100% de especificidad (Figura 18).



Cotina (ng/uL)	1-Especificidad	Sensibilidad	Verdaderos positivos	Verdaderos negativos	Falsos positivos	Falsos negativos
2.87	0	0.8988	151	138	0	17
2.85	0	0.9048	152	138	0	16
2.81	0.0072	0.9048	152	137	1	16
2.8	0.0072	0.9107	153	137	1	15

Figura 18. Curva ROC para evaluar la sensibilidad y especificidad de los distintos valores de corte de cotinina plasmática para identificar los fumadores activos.

4.4. Asociación de la concentración de cotinina con el IMC agrupado.

Se encontraron diferencias entre el IMC agrupado en bajo a normal y sobrepeso y la concentración de cotinina plasmática en la población total de fumadores y no fumadores. Se comparó la concentración de cotinina entre los grupos de IMC bajo a normal y sobrepeso y se observó una $P = 0.004$, una $P = 0.053$ entre los grupos de IMC bajo a normal y obesidad y una $P = 0.876$ entre los grupos de sobrepeso y obesidad (Tabla 4).

IMC	Cotina ng/mL Media de rangos	P
Bajo a normal	126.88	0.004
Sobrepeso	157.12	
Bajo a normal	109.14	0.053
Obesidad	133.40	
Sobrepeso	54.80	0.876
Obesidad	53.76	

Tabla 4. Asociación de la concentración de cotinina plasmática y el IMC agrupado en bajo a normal ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso ($> 25 - < 30 \text{ kg/m}^2$) y obesidad ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$). Para este análisis se eliminaron 17 sujetos debido a la falta de datos de IMC.

4.5. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*1D* y rs1517618 de *SLCO3A1*.

306 sujetos fueron genotificados para las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*1D* y rs1517618 de *SLCO3A1*. Las frecuencias alélicas y genotípicas, EHW y FAM se encuentran en la Tabla 5. Las distribuciones genotípicas de estas variantes fueron consistentes con el EHW con excepción de la variante *CYP2A6*1D* y por esta razón se descartó de los análisis posteriores. No se encontraron homocigotos mutantes para las variantes *CYP2A6*12* y *CYP2A6*1D*.

4.6. Análisis de asociación de la distribución alélica y genotípica de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, rs1517618 de *SLCO3A1* y el hábito de fumar.

Ninguna de las variantes estudiadas mostró asociaciones con el hábito de fumar (Tabla 6) con valor de $P > 0.05$ en todos los casos, ni con el número de cigarrillos consumidos por día en fumadores.

Polimorfismos (silvestre/variante)	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia homocigotos silvestres	Frecuencia heterocigotos	Frecuencia homocigotos mutantes	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*12</i> (<i>CYP2A6/CYP2A7</i>)	0.965	0.035	0.93	0.07	0.0	0.035	0.53
<i>CYP2A6*1D</i> rs4803381 (A/G)	0.67	0.33	0.34	0.65	0.01	0.33	0.0001
<i>SLCO3A1</i> rs1517618 (G/C)	0.93	0.07	0.86	0.14	0.0	0.07	0.17

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas de algunas variantes de genes relacionados con el metabolismo de la nicotina en sujetos fumadores y no fumadores.

<i>CHRNA5</i> (rs16969968)					
	Distribución alélica		Distribución genotípica		
	G	A	Homocigoto silvestre (GG)	Heterocigoto (GA)	Homocigoto mutado (AA)
Fumadores n= 168	268 (79.76%)	68 (20.24%)	105 (62.50%)	58 (34.52%)	5 (2.98%)
No fumadores n= 138	233 (84.42%)	43 (15.58%)	99 (71.74%)	35 (25.36%)	4 (2.90%)
	P = 0.136, OR = 0.72		P = 0.216		
<i>CYP2A6*12</i>					
	<i>CYP2A6</i>	<i>CYP2A6/7</i>	Homocigoto silvestre (<i>CYP2A6/CYP2A6</i>)	Heterocigoto (<i>CYP2A6/7</i>)	Homocigoto mutado (<i>CYP2A7/CYP2A7</i>)
Fumadores n=168	323 (96.13%)	13 (3.87%)	155 (92.26%)	13 (7.74%)	0 (0.0%)
No fumadores n=138	268 (97.10%)	8 (2.90%)	130 (94.20%)	8 (5.80%)	0 (0.0%)
	P = 0.51, OR = 0.74		P = 0.19		
<i>SLCO3A1</i> (rs1517618)					
	G	C	Homocigoto silvestre (GG)	Heterocigoto (GC)	Homocigoto mutado (CC)
Fumadores n=168	306 (91.07%)	30 (8.93%)	138 (82.14%)	30 (17.86%)	0 (0.0%)
No fumadores n=138	261 (94.57%)	15 (5.43%)	123 (89.13%)	15 (10.87%)	0 (0.0%)
	P = 0.085, OR = 0.55		P = 0.071		

Tabla 6. Asociación del hábito de fumar y las distribuciones alélicas y genotípicas de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12* y rs1517618 de *SLCO3A1*.

4.7. Análisis de asociación de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12* rs1517618 de *SLCO3A1* y cotinina en fumadores y no fumadores.

No se encontraron diferencias en los niveles de cotinina de fumadores y no fumadores y las variantes estudiadas. La media de concentración de cotinina en fumadores homocigotos para *CYP2A6*12* (*CYP2A6/CYP2A6*) fue de 22.6 ng/mL, con límite superior de 499.5 ng/mL y la media para los heterocigotos (*CYP2A6/CYP2A7*) fue de 19.6 ng/mL con límite máximo de 148.2 ng/mL (Figura 19.1-A). En el caso de los fumadores homocigotos para la variante rs1517618 de *SLCO2A1* (GG) la media fue de 22 ng/mL con límite superior de 499.5 ng/mL y la media para los heterocigotos (GC) fue de 21.1 ng/mL con límite superior de 266.7 ng/mL (figura 19.1-C) Los fumadores homocigotos silvestres de la variante rs16969968 de *CHRNA5* (GG) fue de 18.8 ng/mL con límite superior de 499.5 ng/mL, heterocigotos (AG) 27.7 ng/mL con límite superior de 27.7 ng/mL y la media de los homocigotos mutados fue de 25.6 ng/mL con límite superior de 25.6 ng/mL. Se puede observar que el genotipo AA es el que muestra menores concentraciones de cotinina y menor límite superior que el genotipo GG homocigoto silvestre, lo opuesto a lo reportado en la literatura. Debido a que la variante rs16969968 de *CHRNA5* está asociado con la dependencia al cigarrillo y no está directamente involucrada con la concentración de cotinina, se realizó un estudio de asociación de los CPD y las variantes genóticas de rs16969968 de *CHRNA5* en fumadores. Se observó que incluso los sujetos con genotipo AA, que es el alelo que se ha asociado a un mayor consumo de cigarrillos, consumieron menor cantidad de CPD (media = 5.7 CPD; límite superior 24 CPD) que los genotipos GG y AG. Después se analizó efecto de la carga genética del alelo A y su relación con los CPD, pero tampoco se observaron diferencias significativas (Figura 19.2).

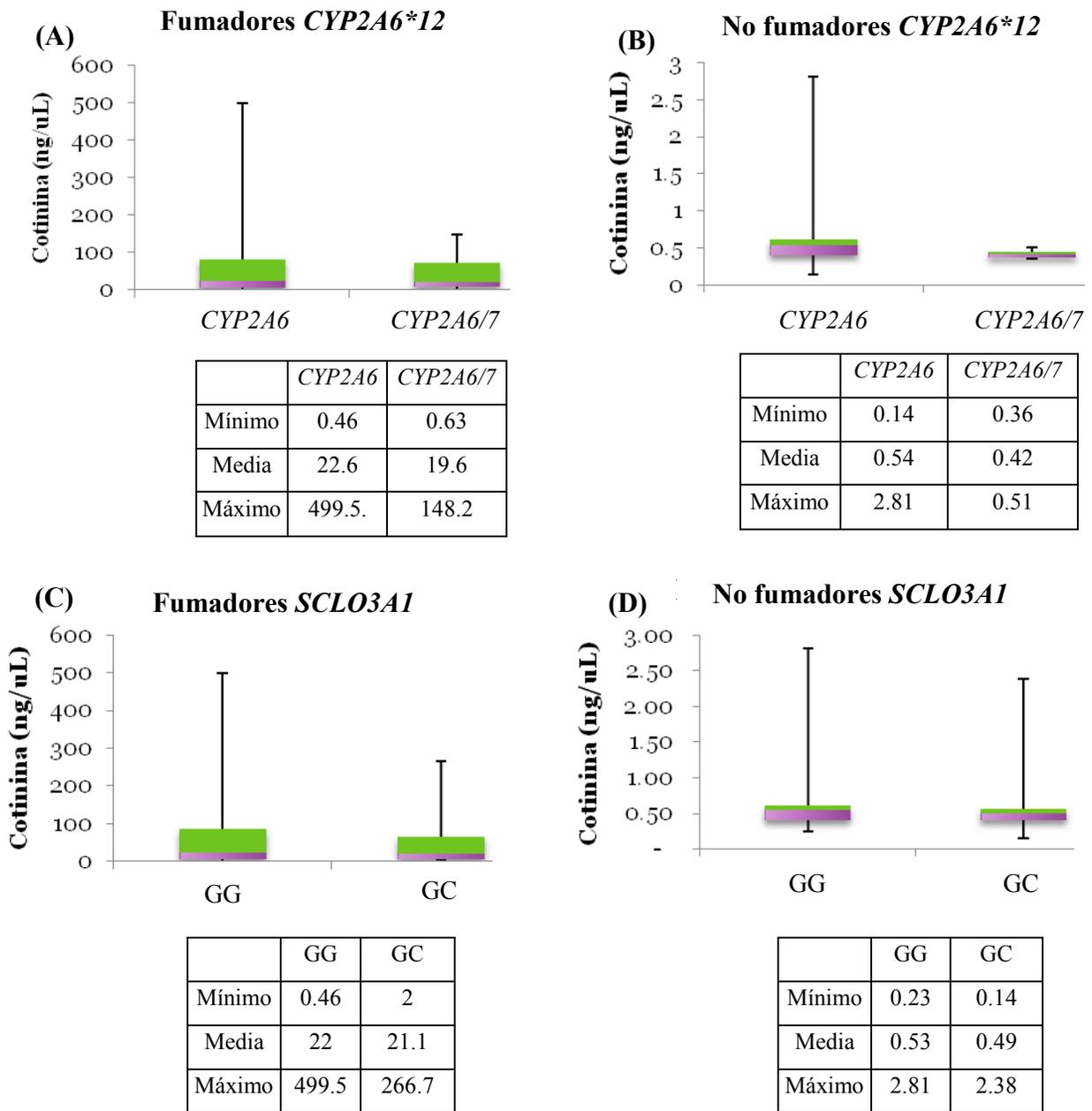


Figura 19.1. Concentración de cotinina plasmática y su asociación con los genotipos de las variantes *CYP2A6*12* y rs1517618 de *SLCO3A1* en fumadores y no fumadores. (A) Concentración de cotinina vs la variante *CYP2A6*12* en fumadores. (B) Concentración de cotinina vs la variante *CYP2A6*12* en no fumadores. (C) Concentración de cotinina vs rs1517618 de *SLCO2A1* en fumadores. (D) Concentración de cotinina vs la variante rs1517618 de *SLCO2A1* en no fumadores.

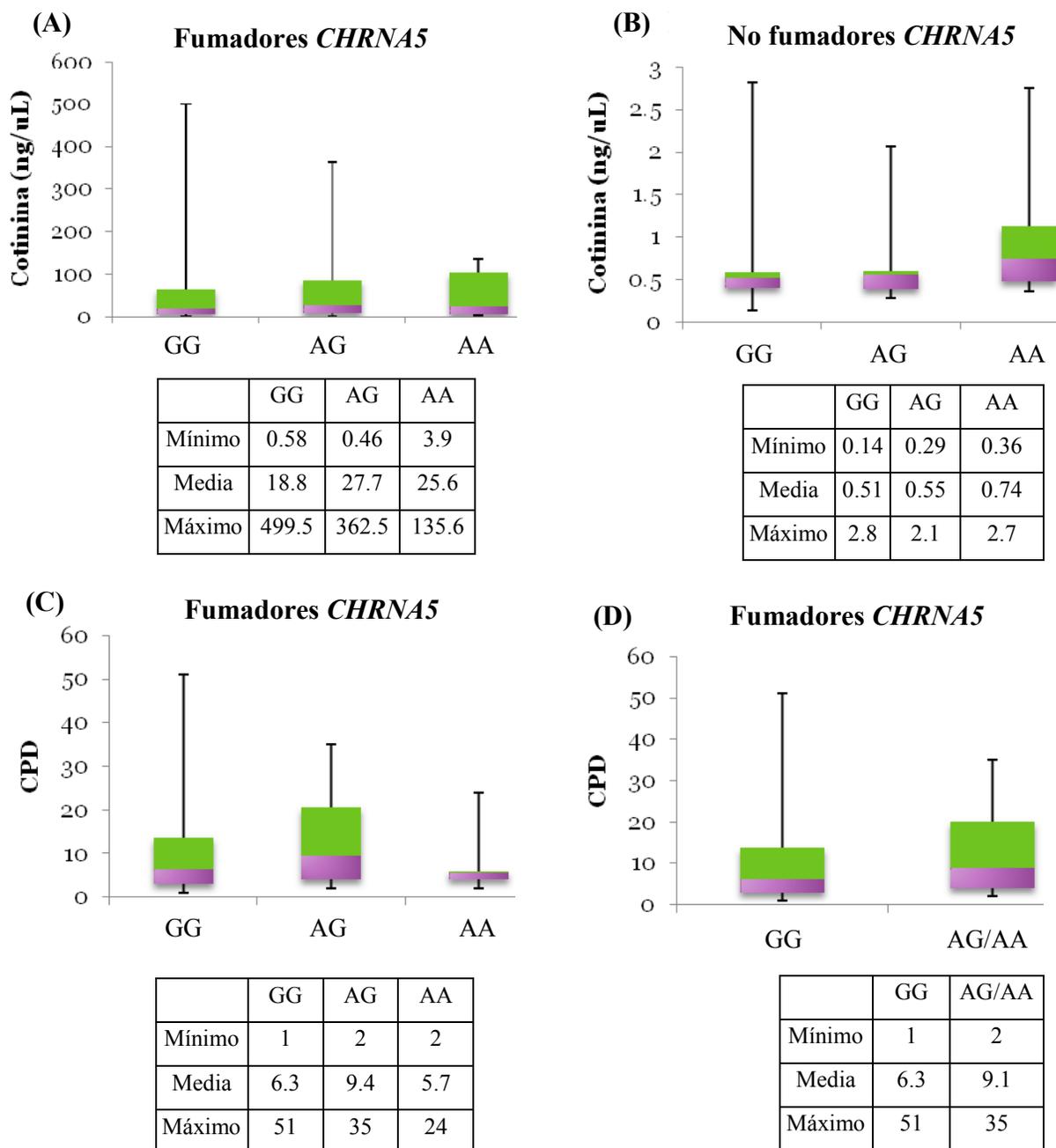


Figura 19.2. Concentración de cotinina plasmática y CPD y su asociación con los genotipos de la variante rs16969968 de *CHRNA5*. (A) Concentración de cotinina vs genotipos de la variante rs16969968 de *CHRNA5* en fumadores. (B) Concentración de cotinina vs genotipos de la variante rs16969968 de *CHRNA5* en no fumadores. (C) CPD vs genotipos de la variante rs16969968 de *CHRNA5* en fumadores. (D) CPD vs genotipo GG y carga alélica de A (AG/AA).

4.8. Asociación de los genotipos de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, rs1517618 de *SLCO3A1* y 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 (normal, sobrepeso y obesidad), *CHRNA5* y tabaquismo como independientes, se obtuvieron significancias de la prueba de Chi cuadrada para genotipo AA de rs16969968 de *CHRNA5* ($P = 0.01$), 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 de rs1517618 *SCLO3A1* y el IMC en fumadores y no fumadores. Asimismo, no se observaron diferencias entre la distribución alélica de rs16969968 de *CHRNA5*, rs1517618 de *SCLO3A1* y *CYP2A6*12* y el IMC (Tabla 7).

CHRNA5 (rs16969968)								
		Distribución alélica			Distribución genotípica			
IMC (kg/m ²)	n	G	A	P	GG	GA	AA	P
Fumadores	158							
≤25		150	32		60	30	1	
> 25 - <30		72	20		27	18	1	
≥ 30		31	11	0.40	12	7	2	0.24
No Fumadores	131							
≤25		161	25		69	23	1	
> 25 - <30		49	9		21	7	1	
≥ 30		12	6	0.08	5	2	2	0.01
CYP2A6*12								
IMC (kg/m ²)	n	CYP2A6	CYP2A7	P	CYP2A6	CYP2A6/7	CYP2A7	P
Fumadores	158							
≤25		178	4		87	4	0	
> 25 - <30		86	6		40	6	0	
≥ 30		41	1	0.17	20	1	0	0.16
No Fumadores	131							
≤25		183	3		90	3	0	
> 25 - <30		55	3		26	3	0	
≥ 30		18	0	0.23	9	0	0	0.22
SCLO3A1 (rs1517618)								
IMC (kg/m ²)	n	G	C	P	GG	GC	CC	P
Fumadores	158							
≤25		167	15		76	15	0	
> 25 - <30		82	10		36	10	0	
≥ 30		39	3	0.70	18	3	0	0.69
No Fumadores	131							
≤25		173	13		80	13	0	
> 25 - <30		57	1		28	1	0	
≥ 30		17	1	0.32	8	1	0	0.30

Tabla 7. Asociación de las variantes alélicas y genotípicas con el IMC agrupado de bajo a normal (≤ 25 kg/m²), con sobrepeso ($> 25 - < 30$ kg/m²) y con obesidad (≥ 30 kg/m²). Para este análisis se eliminaron 17 sujetos debido a que no se tenían datos de IMC.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El tabaquismo es la principal causa de muerte prematura en el mundo (<http://www.who.int/es/>). Aproximadamente el 90% de los adultos fumadores inician el uso del tabaco alrededor de los 18 años de edad y se ha observado que los adolescentes que no comienzan el consumo de tabaco a tempranas edades es poco probable que alguna vez lo hagan (Yuan *et al.* 2015) (<http://www.samhsa.gov/atod/tobacco>). En la población de estudiantes analizada, la mayoría de los jóvenes (20.6%) dijeron haber fumado por primera vez a los 16 años de edad, comenzar a fumar diariamente a los 18 años y la mayoría de los fumadores (31.8%) dijeron fumar de 2 a 5 cigarrillos por día. El 44.42% del total de la población dijeron ser fumadores activos, siendo los hombres el mayor porcentaje de fumadores (53.55%). Estos datos son similares a la ENA del año 2011, que reporta que los fumadores consumen en promedio 6 cigarrillos por día, sin embargo difiere en que la población de 12 a 65 años comienza a fumar diariamente a los 24 años de edad. Según la ENA del mismo año, el 23.6% de la población total de 18 a 65 años dijeron ser fumadores activos de los cuales el 34.6% fueron hombres y el 13.5% mujeres. Por lo tanto, en la población universitaria estudiada los jóvenes comienzan a fumar diariamente a edades más tempranas que las reportadas a nivel nacional y además el porcentaje de fumadores es mayor.

Es importante mejorar las normas de regulación del uso del tabaco en adolescentes ya que durante este período, el cerebro aun está en la etapa de maduración de varios circuitos cerebrales como el sistema dopaminérgico, circuitos que regulan las emociones, los impulsos y el aprendizaje. La nicotina aumenta la actividad neuronal mayormente en los adolescentes, por lo tanto estos son más vulnerables a los efectos de la nicotina y el cigarrillo. Además el uso prolongado puede tener consecuencias a largo plazo sobre el comportamiento, el abuso de drogas o el desarrollo de enfermedades mentales como la esquizofrenia (Yuan *et al.* 2015). Aunque las campañas para la prevención del uso del cigarrillo han tenido resultados positivos en los últimos años, el uso del cigarrillo

electrónico está aumentando y no está sujeto a regulación por la FDA (Paradise 2014).

En la población estudiada, más de 55% de los jóvenes que consumen cantidades substanciales de alcohol también fuman. El consumo de alcohol entre fumadores fue significativamente alto en comparación con los no fumadores ($P < 0.05$). Beber alcohol aumenta las ansias por fumar y varios estudios han demostrado una correlación positiva entre el consumo de alcohol y la cantidad de cigarrillos consumidos (Sharma *et al.* 2014). Algunos estudios han tratado de demostrar las bases biológicas del consumo conjunto de estas drogas y han observado que la administración sistémica de nicotina y etanol incrementa los niveles de dopamina en el núcleo accumbens de manera significativa, en comparación con la exposición a la nicotina ó al alcohol de forma independiente (Doyon *et al.* 2013). Sharma y colaboradores observaron que la co-administración de alcohol y nicotina en el prosencéfalo basal de ratas aumentó significativamente la expresión de *c-fos* en el núcleo accumbens. El gen *c-fos* suele expresarse cuando las neuronas se ven sometidas a estímulos externos y se utiliza como un marcador de actividad neuronal, por lo tanto estos autores proponen que la nicotina y el alcohol aumentan la actividad de recompensa del cerebro aumentando así los efectos placenteros (Sharma *et al.* 2014). Truitt y colaboradores demostraron que la exposición a la nicotina y al alcohol aumenta la expresión del transportador vesicular de glutamato 1 (Vglut1) en el núcleo accumbens, lo cual no se observa con el consumo de estas drogas de manera independiente (Truitt *et al.* 2015). Aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual el etanol produce sus efectos en el cerebro, se sabe que el etanol potencia la acción de GABA (el principal neurotransmisor inhibitor del cerebro) y antagoniza la del glutamato, actuando como un depresor del SNC. La alteración de la homeostasis del glutamato pueden producir neuroplasticidad, que es la base de los comportamientos adictivos (Seine 2014, Valenzuela & Jotty 2015).

Existen numerosos estudios sobre el tabaquismo en los cuales los participantes responden encuestas acerca del hábito de fumar y la exposición ambiental al humo de este; sin embargo, los participantes suelen sobre o subestimar el consumo del tabaco. La cotinina es el principal metabolito de la nicotina, se metaboliza principalmente en el hígado por la enzima CYP2A6 y ha sido ampliamente utilizado como biomarcador de exposición al

humo del cigarrillo en fumadores y en fumadores pasivos. La validación bioquímica de este biomarcador se utiliza para mejorar la precisión de los datos obtenidos por encuestas. En este estudio se estableció un punto de corte de 2.85 ng/mL, para definir fumadores y no fumadores, con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, con esta prueba se detectaron 16 falsos negativos de los 306 analizados (5.2%). 8 de los 16 sujetos falsos negativos dijeron no haber fumado durante las últimas 48 horas y debido a que la cotinina tiene una vida media de 15 a 20 horas ó hasta 40 horas (Baltar *et al.* 2011, Agaku & King 2014), ésta pudo haberse eliminado y no ser detectada. Los 8 sujetos restantes habían consumido de 1 a 2 cigarrillos en las últimas 48 horas. La variabilidad genética de *CYP2A6* y de *UGTs* puede influir en el metabolismo provocando un aumento de la tasa de aclaramiento de la cotinina, por lo cual algunos sujetos podrían estar eliminando cotinina en menor tiempo.

Un punto de corte bajo podría explicar poca exposición al humo ajeno del cigarrillo en no fumadores y por lo tanto valores de cotinina bajos. Por el contrario, si los no fumadores expuestos al humo del cigarrillo tienen valores de cotinina altos, el punto de corte para discriminar a los no fumadores de los fumadores sería más alto (Agaku & King 2014). Sin embargo en estudios que tienen como objetivo la identificación de no fumadores expuestos al humo del cigarrillo sin información adicional, como la declaración realizada por ellos mismos mediante encuestas, un bajo punto de corte podría no ser apropiado para discriminar a los fumadores expuestos y no expuestos al humo del cigarrillo (Balhara & Jain 2013). En este caso la media de concentración de cotinina en no fumadores expuestos al humo del cigarrillo y no expuestos fue de 0.56 y 0.81 ng/mL respectivamente ($P < 0.05$). Es importante tomar en cuenta las características raciales o de etnicidad, ya que las variantes genéticas de *CYP2A6* de cada población pueden causar diferencias en el metabolismo de la nicotina y esto puede dar lugar a diferentes puntos de corte. Benowitz y colaboradores proponen diferentes puntos de corte para diferentes grupos raciales. Ellos estudiaron un grupo de mexicanos residentes en Estados Unidos y proponen un punto de corte de 1 ng/mL, lo que puede indicar que los sujetos no fumadores seleccionados para este estudio tienen baja exposición al humo ajeno del cigarrillo (Benowitz *et al.* 2009).

En este estudio se encontraron diferencias significativas en la concentración de cotinina de fumadores y no fumadores pero no se encontró una correlación lineal entre la concentración de cotinina y los CPD debido a la variabilidad de los datos; sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas al asociar la concentración de cotinina plasmática con los CPD agrupados de 1 a 10, 11 a 20 y más de 20 CPD ($P < 0.05$). Al agrupar los datos con respecto a los CPD, se observa que la mayoría de los que consumen más de 20 CPD tienen niveles más altos de cotinina pero en el grupo que consume de 11 a 20 CPD se encontraron sujetos con niveles más altos en comparación con el grupo que consume más de 20. Estas diferencias pueden ser debidas a la aspiración del humo del tabaco, es decir, que los fumadores que consumen menos cigarrillos inhalan el humo del cigarrillo más profundamente y/o durante un tiempo prolongado, en comparación con los fumadores que consumen más cigarrillos, resultando en cantidades de nicotina y cotinina más altas, por lo tanto es posible encontrar una relación inversa entre CPD y la concentración de cotinina (Zhu *et al.* 2013).

Fumar se ha relacionado con la disminución del IMC. Los fumadores tienen un IMC menor que los no fumadores y la suspensión del hábito de fumar frecuentemente está acompañado con el aumento de peso. Estos efectos se atribuyen a la que la nicotina incrementa el metabolismo y suprime el apetito (Liu *et al.* 2012, Thorgeirsson *et al.* 2013). En este estudio no se encontraron diferencias del IMC entre fumadores y no fumadores; sin embargo, sí se encontraron diferencias en cuanto a la concentración de cotinina y el IMC en fumadores. Se han propuesto algunas teorías sobre el efecto que tiene el humo del cigarrillo y el aumento de la grasa abdominal. Una de ellas es que la nicotina incrementa los niveles plasmáticos de cortisol y esta elevación está asociada con la grasa abdominal (Liu *et al.* 2012). Es de suponer que los fumadores tienen hábitos menos saludables en comparación con los no fumadores, como realizar ejercicio y el consumo de frutas y verduras; no obstante no se encontraron diferencias en cuanto a la actividad física en estos grupos y tampoco en fumadores que consumen cigarrillos diariamente, pero se observó una tendencia hacia un mayor consumo de frutas y verduras en no fumadores ($P = 0.06$).

Se analizaron las distribuciones alélicas y genotípicas de algunas variantes de *CYP1A1*, *CYP2E1* y *GSTP1* que están relacionadas con el metabolismo de NNK y se encontró que

las variantes se encuentran en EHW con excepción de las variantes *CYP2E1-DraI* y M2 de *CYP1A1*. Estos resultados indican que estas variantes existen en la población norestense estudiada y que es posible realizar estudios de toxicogenética de NNK en esta comunidad para identificar factores de riesgo a enfermedades ocasionadas por el tabaquismo. También se analizaron las distribuciones alélicas y genóticas de las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*1D* y rs1517618 de *SLCO3A1* que se han relacionado con metabolismo de la nicotina y adicción. Las frecuencias alélicas de la variante rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12* y la variante rs1517618 de *SLCO3A1* fueron 0.185, 0.035 y 0.07, respectivamente. La frecuencia del alelo A de la variante rs16969968 fue baja en comparación con caucásicos europeos, pero alta en comparación con las poblaciones afro-americanas y asiáticas orientales (0.42, 0.07 y < 0.05, respectivamente) (Sasaki *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2012, Doyle *et al.* 2014) (<http://www.hapmap.org>) y similares a las reportadas para la población de mexicanos residentes en Los Ángeles (0.19) (www.1000genomes.org). La frecuencia de *CYP2A6*12* resultó más alta que la encontrada en los caucásicos europeos y japoneses (0.02 y 0.008 respectivamente) (Oscarson *et al.* 2002, Malaiyandi *et al.* 2005) y la frecuencia de rs1517618 de *SLCO3A1* fue menor a la reportada en caucásicos europeos, americanos, asiáticos y mexicanos residentes en Los Ángeles (0.17, 0.08, 0.03 y 0.08) (www.1000genomes.org). La variante *CYP2A6*1D* no ha sido estudiada en diferentes poblaciones, solo se encontraron datos de esta variante en la población caucásica europea donde se reporta una frecuencia de 0.50 (<http://www.hapmap.org>), que es mayor a la encontrada en este trabajo (0.33). Todas las variantes estuvieron en EHW con excepción de la variante *CYP2A6*1D* y por esta razón fue descartada de los análisis posteriores. Como se mencionó anteriormente, estas variantes se han relacionado con el hábito de fumar; sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias de las variantes estudiadas con el hábito de fumar ni con la concentración de cotinina. La mayoría de los estudios de asociación de las variantes en *CHRNA5-A3-B4* se han realizado en sujetos de origen caucásico europeo y pocos son los estudios en sujetos con ancestría americana. Zhu y colaboradores tampoco encontraron ninguna asociación de la variante rs16969968 de *CHRNA5* y el hábito de fumar en afroamericanos. Inclusive el alelo A de rs16969968 se asoció con una alta abstinencia durante una terapia placebo de reemplazo de nicotina, lo opuesto a lo observado en caucásicos. Por lo tanto, es posible asumir que los efectos de los

SNPs sean diferentes entre los diferentes grupos étnicos debido a distintos haplotipos (Zhu *et al.* 2014). También es relevante tomar en cuenta que nuestro estudio se realizó con un número relativamente bajo de muestras ($n = 306$) en comparación con otros estudios. En el estudio de Saccone y colaboradores, se analizaron un total de 2,062 europeos-americanos, se observó una alta frecuencia de la variante rs16969968 (0.650) y se encontró asociación de la variante con la dependencia a la nicotina (Saccone *et al.* 2009). Sin embargo, en el estudio realizado por Zhu y colaboradores, en el que se analizaron 400 sujetos de Alaska, ellos observaron una baja frecuencia de la variante rs16969968 (0.06 en fumadores) y no se encontró asociación con el consumo de cigarrillos (Zhu *et al.* 2013). Por lo tanto, el número de muestra y la frecuencia de la variante pueden ser factores importantes en los hallazgos de los estudios de asociación.

La variante rs16969968 de *CHRNA5* se ha asociado con la dependencia al cigarrillo y el número de CPD, sin embargo en este estudio no se encontró asociación entre la variante rs16969968 de *CHRNA5* y los CPD, incluso se observó que los sujetos con la variante rs16969968 de *CHRNA5* consumen menor cantidad de CPD que los sujetos con el alelo silvestre.

Como se mencionó anteriormente, la nicotina es considerada un supresor del apetito y control del peso corporal del cigarrillo (Jo *et al.* 2002). Mineur y colaboradores, 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 nicotina (Mineur *et al.* 2012). Aunque en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre el IMC y el tabaquismo, se observó que el alelo A de la variante rs16969968 del gen *CHRNA5* se asoció significativamente con el IMC de manera exclusiva en los no fumadores, coincidiendo con lo reportado en estudios previos por Taylor y colaboradores en el 2014 (Taylor *et al.* 2014). Es importante mencionar que esta diferencia tiene un carácter exploratorio, dado el hecho de la baja prevalencia de homocigotos mutados (AA). No obstante, 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. Zhu y colaboradores reportaron que la variante rs16969968 del gen *CHRNA5* está

asociada con la obesidad abdominal en aborígenes americanos pero esta asociación es independiente del IMC y del tabaquismo (Zhu *et al.* 2014). De manera similar, Freathy y colaboradores encontraron asociaciones de la variante rs1051730 en el gen *CHRNA3*, con el IMC bajo en sujetos caucásicos europeos no fumadores que alguna vez fumaron. Esto parece indicar que el SNC está involucrado en los mecanismos que provocan la acumulación de grasa abdominal y el aumento del IMC y que las discrepancias pueden ser atribuidas a las diferencias genéticas entre aborígenes americanos y otras poblaciones (Freathy *et al.* 2011). El alelo A de la variante rs16969968 de *CHRNA5* también se ha relacionado con comportamientos adictivos hacia otras drogas. Se ha reportado que esta variante funciona como un factor protector para la dependencia a la cocaína (Grucza *et al.* 2008) y los niveles elevados de ARNm de *CHRNA5* se han relacionado con la dependencia al alcohol (Wang *et al.* 2009). En este estudio no se encontraron diferencias entre el consumo de alcohol y la variante rs16969968 de *CHRNA5*. Consecuentemente, 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 con alto contenido de grasas o altamente dulces pueden ser "adictivos", de una manera similar a la que se presenta en el abuso de las drogas (Avena & Gold 2011, Avena *et al.* 2012). Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios para identificar los mecanismos involucrados en este tipo de adicción.

En este estudio se genotipificaron por primera vez las variantes M1, M2 y M4 de *CYP1A1*, *PstI* y *DraI* de *CYP2E1* y rs1695 *GSTP1* asociadas con el metabolismo de NNK y las variantes rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*1D* y rs1517618 de *SLCO3A1*, asociadas con el hábito de fumar en población mexicana, sin embargo no se encontraron asociaciones con el hábito de fumar, CPD y con la concentración de cotinina, por lo que se aceptan las hipótesis nulas planteadas en este trabajo. Sin embargo se encontró asociación de la variante rs16969968 de *CHRNA5* con el IMC exclusivamente en sujetos no fumadores.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de algunas variantes involucradas en el metabolismo de NNK y nicotina y se encontró que las variantes *CYP1A1-M1*, *CYP1A1-M4*, *CYP2E1-PstI*, rs1695 de *GSTP1*, rs16969968 de *CHRNA5*, *CYP2A6*12* y rs1517618 de *SCLO3A1* están presentes en la población estudiada y están en EHW. Por consiguiente es posible continuar con estudios de adicción al tabaco y afecciones relacionadas en nuestra población.

Se consiguió cuantificar la concentración de cotinina en fumadores y no fumadores, los cuales tuvieron resultados diferentes ($P < 0.05$). El método de cuantificación de cotinina tuvo altos niveles de sensibilidad y especificidad y se propuso un punto de corte de 2.5 ng/mL para discriminar entre fumadores y no fumadores.

No se encontró asociación entre variantes relacionadas con el metabolismo y adicción a la nicotina con el hábito de fumar, CPD y concentración plasmática de cotinina, posiblemente debido a un bajo número de muestra y a las diferencias genotípicas en las diferentes poblaciones. Existen otras variantes genéticas de *CYP2A6* y en diferentes subunidades de los genes nAChR que también se han relacionado con tabaquismo y adicción, las cuales habría que analizar en esta población para identificar variantes que caractericen a sujetos en riesgo de enfermedades debidas al tabaquismo y proponer nuevos blancos terapéuticos ó nuevas estrategias para dejar de fumar.

La variante rs16969968 del gen *CHRNA5* resultó estadísticamente diferente ($P < 0.01$) en sujetos no fumadores con elevado IMC. Aunque esta diferencia tiene un carácter exploratorio debido a la baja prevalencia de homocigotos AA, es importante investigar si este polimorfismo tiene un papel en la modulación de la ingesta de alimentos.

REFERENCIAS

1. Agaku IT, King B a (2014) Validation of Self-Reported Smokeless Tobacco Use by Measurement of Serum Cotinine Concentration Among US Adults. *American journal of epidemiology*14: 1-6.
2. Appleton S, Olegario RM, Lipowicz PJ (2014) TSNA exposure from cigarette smoking: 18 years of urinary NNAL excretion data. *Regulatory toxicology and pharmacology*68: 269–74.
3. Avena NM, Gold MS (2011) Variety and hyperpalatability: are they promoting addictive overeating. *Am J Clin Nutr* 94: 367–368.
4. Avena NM, Gold J a, Kroll C, Gold MS (2012) Further developments in the neurobiology of food and addiction: update on the state of the science. *Nutrition* 28: 341–3.
5. Balhara YPS, Jain R (2013) A receiver operated curve-based evaluation of change in sensitivity and specificity of cotinine urinalysis for detecting active tobacco use. *Journal of cancer research and therapeutics* 9: 84–9.
6. Baltar VT, Xun WW, Chuang S (2011) Smoking , Secondhand Smoke , and Cotinine Levels in a Subset of EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:869-875.
7. Bavarva JH, Tae H, McIver L, Garner HR (2014) Nicotine and oxidative stress induced exomic variations are concordant and overrepresented in cancer-associated genes. *Oncotarget* 5: 4788–98.
8. Benowitz NL (2009) Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology* 49: 57–71.
9. Benowitz N (2010a) Nicotine Addiction. *The New England Journal of Medicine* 362: 2295–2303.
10. Benowitz NL (2010b) Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 57–71.
11. Benowitz NL, Bernert JT, Caraballo RS, Holiday DB, Wang J (2009) Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers within

-
-
- different racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004. *American Journal of Epidemiology* 169: 236–248.
12. Bierut LJ, Stitzel JA, Ph D, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S et al. (2008) Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry* 169: 1163–1171.
 13. Cerda J, Cifuentes L (2012) Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología* 29: 138–141.
 14. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang W-Y, Sinha R, Sampson JN, Moore SC (2014) Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 35: 1516–22.
 15. Doyle G, Chou AD, Saung WT, Lai AT, Lohoff FW, Berrettini WH (2014) Identification of CHRNA5 rare variants in African-American heavy smokers. *Psychiatric genetics* 24: 102–9.
 16. Doyon WM, Thomas AM, Ostroumov A, Dong Y, Dani J. (2013) Potential substrates for nicotine and alcohol interactions: A focus on the mesocorticolimbic dopamine system. *Biochemical Pharmacology* 86: 1181–1193.
 17. Duell EJ (2012) Epidemiology and potential mechanisms of tobacco smoking and heavy alcohol consumption in pancreatic cancer. *Molecular carcinogenesis* 51: 40–52.
 18. El-Sheikh AAK, Masereeuw R, Russel FGM (2008) Mechanisms of renal anionic drug transport. *European Journal of Pharmacology* 585: 245–255.
 19. Erdozain AM, Callado LF (2014) Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review *Alteraciones neurobiológicas en el alcoholismo: Adicciones*. 26: 360–370.
 20. Fowler CD, Tuesta L, Kenny PJ (2013) Role of $\alpha 5^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology* 13: 503–513.
 21. Freathy RM, Kazeem GR, Morris RW, Johnson PCD, Paternoster L, Ebrahim S, Hattersley AT, Hill A, Hingorani AD, Holst C et al. (2011) Genetic variation at CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 interacts with smoking status to influence body mass index. *International journal of epidemiology* 40: 1617–28.

-
-
22. Grando SA (2014) Connections of nicotine to cancer. *Nature reviews. Cancer* 14: 419–29.
 23. Grucza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, Buchholz KK, Cloninger CR, Neuman RJ, Budde JP et al. (2008) A risk allele for nicotine dependence in *CHRNA5* is a protective allele for cocaine dependence. *Biological psychiatry* 64: 922–9.
 24. Hagenbuch B, Gui C (2008) Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 38: 778–801.
 25. Harris AC, Tally L, Muelken P, Banal A, Schmidt CE, Cao Q, LeSage MG (2015) Effects of nicotine and minor tobacco alkaloids on intracranial-self-stimulation in rats. *Drug and Alcohol Dependence* 153: 330–334.
 26. Hecht SS, Hochalter JB, Villalta PW, Murphy SE (2000) 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 12493–12497.
 27. Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR (2013) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Frontiers in Psychiatry* 4: 1–16.
 28. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacology & therapeutics* 116: 496–526.
 29. Malson JL, Sims K, Murty R (2001) Comparison of the nicotine content of tobacco used in bidis and conventional cigarettes. *Tob Control* 10: 181–183.
 30. Jensen KP, DeVito EE, Herman AI, Valentine GW, Gelernter J, Sofuoglu M (2015) A *CHRNA5* Smoking Risk Variant Decreases the Aversive Effects of Nicotine in Humans. *Neuropsychopharmacology* 15: 1–9.
 31. Jo Y-H, Talmage DA, Role LW (2002) Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. *Journal of neurobiology* 53: 618–32.

-
-
32. Klink ME, Jonsdottir H (2014) Smoking addiction in chronic obstructive pulmonary disease: Integrating neurobiology and phenomenology through a review of the literature. *Chronic Respiratory Disease* 11: 229–236.
 33. Kuri-morales PA, C M, González-roldán JF, Hoy MJ, Cortés-ramírez M, Pa K, Jf G (2006) *Epidemiología del tabaquismo en México*. 48: 91–98.
 34. Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J (2011) Acetylcholine Receptor (AChR) 5 Subunit Variant Associated with Risk for Nicotine Dependence and Lung Cancer Reduces $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ AChR Function. *Molecular pharmacology* 79: 119–125.
 35. Liu T, David SP, Tyndale RF, Wang H, Yu XQ, Chen W, Zhou Q, Chen WQ (2012) Relationship between amounts of daily cigarette consumption and abdominal obesity moderated by CYP2A6 genotypes in Chinese male current smokers. *Annals of behavioral medicine : a publication of the Society of Behavioral Medicine* 43: 253–61.
 36. Macqueen DA, Heckman BW, Blank MD, Janse Van Rensburg K, Park JY, Drobles DJ, Evans DE (2014) Variation in the $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor subunit gene predicts cigarette smoking intensity as a function of nicotine content. *The pharmacogenomics journal* 14: 70–6.
 37. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF (2005) Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clinical pharmacology and therapeutics* 77: 145–58.
 38. Mattes W, Yang X, Michael O, Richter RP, Donna L M (2015) Biomarkers of tobacco smoke. *Advances in Clinical Chemistry* 67: 1-33.
 39. May E. Montasser, Shimmin LC, Craig L. Hanis, Boerwinkle E (2010) Gene by Smoking Interaction in Hypertension: Identification of a Major QTL on Chromosome 15q for Systolic Blood Pressure in Mexican Americans 9: 1–14.
 40. McDonagh EM, Wassenaar C, David SP, D.Phil SM, Tyndale RF, Altman RB, Klein TE. (2012) PharmGKB Summary - Very Important Pharmacogene Information for Cytochrome P-450, Family 2, Subfamily A, polypeptide 6 (CYP2A6). *Pharmacogenet Genomics*. 29: 997–1003.
 41. Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, Dileone RJ, Diano S, Biasi M De, Horvath TL, Gao X, Picciotto MR (2012) Nicotine Decreases Food Intake Through

Activation of POMC Neurons. *Science* 332: 1330–1332.

42. Morel C, Fattore L, Pons S, Hay YA, Marti F, Lambolez B, De Biasi M, Lathrop M, Fratta W, Maskos U et al. (2014) Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Molecular psychiatry* 19: 1–7.
43. Nakanishi T and Tamai I (2014) Putative roles of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in cell survival and progression of human cancers. *Biopharmaceutics & drug disposition* 28: 135–143.
44. Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G, Ahn S-Y, Liu HC, Richard E, Bhatnagar V, Wu W (2015) The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiological Reviews* 95: 83–123.
45. Nutt DJ, Lingford-hughes A, Erritzoe D, Stokes PRA (2015) The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nature Reviews Neuroscience* 1-8.
46. Oscarson M, McLellan R a, Asp V, Ledesma M, Bernal Ruiz ML, Sinues B, Rautio A, Ingelman-Sundberg M (2002) Characterization of a novel CYP2A7/CYP2A6 hybrid allele (CYP2A6*12) that causes reduced CYP2A6 activity. *Human mutation* 20: 275–83.
47. Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Gullste H (2001) Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Clin Pharmacol* 52: 357–363.
48. Pitarque M, Von Richter O, Rodríguez-Antona C, Wang J, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M (2004) A Nicotine C-Oxidase Gene (CYP2A6) Polymorphism Important for Promoter Activity. *Human Mutation* 23: 258–266.
49. Quattrocchi OA, Andrizzi SA, Laba RF (1992) Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Capítulo 10. Buenos Aires, Argentina. pag: 318.
50. Raunio H, Rahnasto-Rilla M (2012) CYP2A6: Genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 27: 73–88.
51. Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, Gruzca R a, Sun L, Duan W, Budde J et al. (2009) The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer research* 69: 6848–56.

-
-
52. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, Fujii Y (2010) CHRNA5 gene D398N polymorphism in Japanese lung adenocarcinoma. *The Journal of surgical research* 162: 75–8.
 53. Sharma R, Dumontier S, DeRoode D, Sahota P, Thakkar MM (2014) Nicotine Infusion in the Wake-Promoting Basal Forebrain Enhances Alcohol-Induced Activation of Nucleus Accumbens. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 38: 2590–2596.
 54. Siedlinski M, Cho MH, Bakke P, Gulsvik A, Lomas D a, Anderson W, Kong X, Rennard SI, Beaty TH, Hokanson JE et al. (2011) Genome-wide association study of smoking behaviours in patients with COPD. *Thorax* 66: 894–902.
 55. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A (2011) Hazardous compounds in tobacco smoke. *International journal of environmental research and public health* 8: 613–28.
 56. Tanner JA., Novalen M, Jatlow P, Huestis M a., Murphy SE, Kaprio J, Kankaanpaa a., Galanti L, Stefan C, George TP et al. (2015) Nicotine Metabolite Ratio (3-Hydroxycotinine/Cotinine) in Plasma and Urine by Different Analytical Methods and Laboratories: Implications for Clinical Implementation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1-20.
 57. Taylor AE, Morris RW, Fluharty ME, Bjorngaard JH, Asvold BO, Gabrielsen ME, Campbell A, Marioni R, Kumari M, Hällfors J et al. (2014) Stratification by Smoking Status Reveals an Association of CHRNA5-A3-B4 Genotype with Body Mass Index in Never Smokers. *PLoS genetics* 10: 1–6.
 58. Thakkar N, Lockhart AC, Lee W (2015) Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATPs) in Cancer Therapy. *The AAPS Journal* 17: 535-545.
 59. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Sulem P, Besenbacher S, Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Walters GB, Furberg H, Sullivan PF, Marchini J et al. (2013) A common biological basis of obesity and nicotine addiction. *Translational psychiatry* 3: 1–7.
 60. Truitt W a., Hauser SR, Deehan G a., Toalston JE, Wilden J a., Bell RL, McBride WJ, Rodd Z a. (2015) Ethanol and nicotine interaction within the posterior ventral tegmental area in male and female alcohol-preferring rats: evidence of synergy and

-
-
- differential gene activation in the nucleus accumbens shell. *Psychopharmacology* 232: 639–649.
61. Turner JR, Gold A, Schnoll R, Blendy J a, Pierce RC, Wolf ME, Schmidt HD, McGinty JF, Anne E, Picciotto MR et al. (2013) Translational Research in Nicotine Dependence. : 1–11.
 62. Valenzuela CF, Jotty K (2015) Mini-Review: Effects of Ethanol on GABAA Receptor-Mediated Neurotransmission in the Cerebellar Cortex—Recent Advances. *The Cerebellum*: 438–446.
 63. Vardavas CI, Fthenou E, Patelarou E, Bagkeris E, Murphy S, Hecht SS, Connolly GN, Chatzi L, Kogevinas M (2012) Exposure to different sources of second-hand smoke during pregnancy and its effect on urinary cotinine and tobacco-specific nitrosamine (NNAL) concentrations. *Tobacco Control*: 194–200.
 64. Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD (2013) Obesity and addiction: Neurobiological overlaps. *Obesity Reviews* 14: 2–18.
 65. Volkow ND, Wang GJ, Fowler DT (2012) Food and Drug Reward: Overlapping Circuits in Human Obesity and Addiction. *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*: 289–320.
 66. Wang JC, Grucza R, Cruchaga C, Hinrichs a L, Bertelsen S, Budde JP, Fox L, Goldstein E, Reyes O, Saccone N et al. (2009) Genetic variation in the *CHRNA5* gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Molecular psychiatry* 14: 501–10.
 67. Wang KS, Liu X, Zhang Q, Zeng M (2012) *ANAPC1* and *SLCO3A1* are associated with nicotine dependence: Meta-analysis of genome-wide association studies. *Drug and Alcohol Dependence* 124: 325–332.
 68. Wei SC, Tan YY, Weng MT, Lai LC, Hsiao JH, Chuang EY, Shun CT, Wu DC, Kao AW, Chuang CS et al. (2014) *SLCO3A1*, a novel Crohn’s disease-associated gene, regulates NF- κ B activity and associates with intestinal perforation. *PLoS ONE* 9: 1–9.
 69. Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD (2014) Contribution of Variants in *CHRNA5/A3/B4* Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Molecular neurobiology* 14: 1-13

-
-
70. Xu C, Goodz S, Sellers EM, Tyndale RF (2002) CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 1245–1256.
 71. Yang I a, Holloway JW, Fong KM (2013) Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *Journal of thoracic disease* 5: S454–62.
 72. Yee S, Nguyen AN, Brown C, Savic RM, Zhang Y, Castro RA, Cropp CD, Choi JH, Singh D, Tahara H, Stocker S, Huang Y, Brett CM, Giacomini KM (2013) Reduced Renal Clearance of Cefotaxime in Asians with a Low-Frequency Polymorphism of OAT3 (SLC22A). *Journal of pharmaceutical sciences* 99: 4215–4227.
 73. Yuan JM, Butler LM, Stepanov I, Hecht SS (2014) Urinary tobacco smoke-constituent biomarkers for assessing risk of lung cancer. *Cancer Research* 74: 401–411.
 74. Yuan M, Cross SJ, Loughlin SE, Leslie FM (2015) Nicotine and the adolescent brain. *The Journal of Physiology* 0: 1-16.
 75. Zhou H, Yang J, Li D, Xiao J, Wang B, Wang L, Ma C, Xu S, Ou X, Feng Y (2012) Association of IREB2 and CHRNA3/5 polymorphisms with COPD and COPD-related phenotypes in a Chinese Han population. *Journal of human genetics* 57: 738–46.
 76. Zhu AZX, Binnington MJ, Renner CC, Lanier AP, Hatsukami DK, Stepanov I, Watson CH, Sosnoff CS, Benowitz NL, Tyndale RF (2013) Alaska Native smokers and smokeless tobacco users with slower CYP2A6 activity have lower tobacco consumption, lower tobacco-specific nitrosamine exposure and lower tobacco-specific nitrosamine bioactivation. *Carcinogenesis* 34: 93–101.
 77. Zhu AZX, Renner CC, Hatsukami DK, Benowitz NL, Tyndale RF (2013) CHRNA5-A3-B4 genetic variants alter nicotine intake and interact with tobacco use to influence body weight in Alaska Native tobacco users. *Addiction (Abingdon, England)* 108: 1818–28.
 78. Zhu Y, Yang J, Yeh F, Cole S a., Haack K, Lee ET, Howard B V., Zhao J (2014) Joint Association of Nicotinic Acetylcholine Receptor Variants with Abdominal Obesity in American Indians: The Strong Heart Family Study. *PLoS ONE* 9: e102220.

-
-
79. Zhu AZX, Zhou Q, Cox LS, David SP, Ahluwalia JS, Benowitz NL, Tyndale RF (2014) Association of CHRNA5-A3-B4 SNP rs2036527 with smoking cessation therapy response in African American smokers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 96: 256–265.
 80. Ziauddeen H, Alonso-alonso M, Hill JO, Kelley M, Khan N a (2015) Obesity and the Neurocognitive Basis of Food Reward and the Control of Intake. *Advances in Nutrition*: 3–5.

FUENTES DE INERNET

1. <http://www.who.int/es/>
2. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
3. <http://www.drugabuse.gov>
4. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>
5. <http://www.1000genomes.org>

ANEXO 1

ENCUESTA PARA LOS PARTICIPANTES DEL PROYECTO ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS Y TOXICOGENÓMICOS PARA UN GRUPO SELECCIONADO DE CARCINÓGENOS DEL TABACO EN SUJETOS JÓVENES VOLUNTARIOS.

Estimado alumno de la Universidad Autónoma de Nuevo León, le solicitamos responder el siguiente cuestionario de forma **voluntaria**. Este cuestionario es parte de un estudio que se está realizando en la Facultad de Medicina. La información que nos proporcione es muy valiosa y nos ayudará a tener más datos sobre el hábito de fumar en la comunidad universitaria. Sus respuestas serán mantenidas **en forma estrictamente confidencial y ninguna persona podrá ser identificada** durante y después del estudio.

I.- DATOS PERSONALES Clave: _____ **1.1** Edad: _____

1.2 Sexo. Femenino _____ Masculino _____ **1.3** Estatura: _____ **1.5** Peso _____

2. Nivel educativo más alto alcanzado:

3.1 Ninguno: _____ **3.2** Primaria: _____ **3.3** Secundaria: _____ **3.4** Escuela Técnica: _____

3.5 Preparatoria: _____ **3.6** Licenciatura: _____ **3.7** Posgrado: _____ **3.8** Otro

¿Cuál?: _____

3. Ciudad de procedencia: _____

4. ¿En qué estado de la Republica nacieron sus abuelos?

2.1 Abuelo materno: _____ **2.2** Abuela materna: _____

2.3 Abuelo paterno: _____ **2.4** Abuela paterna: _____

5. Nivel de ingreso familiar mensual (Moneda nacional):

4.1 Menos de \$ 5,000.00: _____ **4.2** \$ 20,000.00 a \$ 29,999.00: _____

4.3 \$ 5,000.00 a \$ 10,000.00: _____ **4.4** \$ 40,000.00 a \$ 49,999.00: _____

4.5 \$ 10,000.00 a \$ 15,000.00: _____ **4.6** \$ 50,000.00 a \$ 59,999.00: _____

4.7 \$ 15,000.00 a \$ 19,999.00: _____ **4.8** Más de \$ 60,000.00 _____

6. Número de personas que dependen de este ingreso: _____

7. Antecedentes familiares

7.1 Familiares con cáncer de pulmón: _____

7.2 Familiares con otro tipo de cáncer (especifique cual): _____

8. Antecedentes personales patológicos

8.1 Diabetes mellitus: Sí _____ No _____ **7.2** Hipertensión arterial Sí _____ No _____

8.3 ¿Usted sufre de alguna enfermedad pulmonar, hepática ó renal? _____

8.4 ¿Algún tipo de cáncer? _____

II.- CONSUMO DE TABACO

9. ¿Es usted fumador / a?

9.1 Sí _____ 9.2 No _____

10.- Sí la respuesta de la pregunta 9 es No,
¿Alguna vez fumó?

10.1 Sí _____ 10.2 No _____

10.3 ¿Hace cuantos años dejó de fumar?

11. ¿Cuántos años tenía cuando fumó por primera vez?

11.1 Nunca he fumado

11.2

10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21
Más de 21					

12. ¿Fuma diariamente?

12.1. Sí _____ 12.2. No _____

12.3 ¿A qué edad comenzó a fumar diariamente?

10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21
Más de 21					

13. Durante los pasados 15 días, ¿cuántos días fumó?

13.1 Todos los días

13.2 Más de la mitad del tiempo 8-15 días

13.3 Menos de la mitad del tiempo (1-7 días)

13.4 Solo a veces (1-5 días)

13.5 Rara vez (1-3 días)

13.6 Ninguno

14. Durante los pasados 15 días, en los días en que fumó, ¿cuántos cigarros consumió?

14.1 Más de 20 cigarros / día (más de 1 cajetilla)

14.2 11 a 20 cigarros por día (más de media cajetilla)

14.3 6 a 10 cigarros por día (más de cuarto de cajetilla)

14.4 2 a 5 cigarros por día

14.5 1 cigarro por día

14.6 Menos de un cigarro por día

14.7 No fumé durante los pasados 30 días

15. Durante los pasados 15 días, ¿qué marca de cigarros fumó con mayor frecuencia? (seleccionar una sola respuesta)

15.1 No fumé cigarros durante los pasados 30 días

15.2 Ninguna marca especial

15.3 Marlboro

15.4 Broadway

15.5 Boots

15.6 Montana

15.7 Camel

15.8 Otra marca, ¿cuál? _____

16. Durante los pasados 15 días, ¿alguna vez utilizó tabaco en otra forma que no fueran cigarros? (por ejemplo: puros, pipa, cigarros pequeños, etc.)

16.1 Sí _____ 16.2. ¿Cuál _____

16.3 No _____

17.- Detalle su consumo de cigarrillo lo mejor posible de los últimos 3 días

17.1 Anteayer

17.1.1 Núm. cigarrillos en la mañana _____

17.1.2 Núm. cigarrillos en la tarde _____

17.1.3 Núm. cigarrillos en la noche _____

17.2 Ayer

17.2.1 Núm. cigarrillos en la mañana _____

17.2.2 Núm. cigarrillos en la tarde _____

17.2.3 Núm. cigarrillos en la noche _____

17.3 Hoy

17.3.1 Núm. cigarrillos en la mañana _____

17.3.2 Núm. cigarrillos en la tarde _____

17.4 No he fumado _____

18.- ¿Cuántas horas lleva sin fumar el día de hoy? _____ No he fumado _____

19. ¿Ha estado expuesto al humo del tabaco las últimas 48 horas?

20. Alguien fumó en su presencia en lugares abiertos en las últimas 48 horas?

20.1 Sí _____ 20.2 No _____

21. Durante las últimas 48 horas ¿alguien ha fumado en espacios cerrados en su presencia?

21.1 Sí _____ 21.2 No _____

22. ¿Con qué frecuencia alguna persona fuma en lugares cerrados en su presencia?

22.1 Todos los días _____

22.2 Todas las semanas _____

22.3 Todos los meses _____

22.4 Menos de una vez al año _____

22.5 Nunca _____

22. ¿Alguien fumó dentro de alguno de los bares, clubes nocturnos ó centros recreativos a los que ha ido en las últimas 48 horas?

23.1 Sí _____ 23.2

No _____

23.3 No he ido a ese tipo de lugares _____

24. ¿Cuántas personas fumadoras viven en su casa _____

25. ¿Con qué frecuencia alguien fuma dentro de su casa?

25.1 Todos los días

25.2 Al menos una vez por semana

25.3 Al menos una vez al mes

25.4 Al menos una vez al año

25.5 Nunca

26. Durante los pasados 15 días, ¿utilizó productos que contienen nicotina para dejar de fumar? (por ejemplo: chicles, parches, enjuagues bucales, etc.)

19.1 Sí _____ 19.2 No _____

26.1 Sí _____ 26.2 ¿Cuál? _____

26.3 No _____

27.- ¿Consumes carnes rojas?

27.1 No

27.2 Menos de 5 veces (1500g) /semana

27.3 5-15 veces (1500-4500) /semana

27.4 Más de 15 veces (4500 g) /semana

27.5 Años consumiendo: _____

27.6 Tiempo sin consumir: _____

28. ¿Consumes comida procesada al carbón o a la leña?

28.1 Sí _____ 28.2 No _____

29. ¿Esta usted expuesto al humo del carbón o leña?

29.1 No _____

29.2 Una vez al mes _____

29.3 Los fines de semana _____

29.4 Todos los días _____

30. ¿Consumes frutas y verduras diariamente?

30.1 No

30.2 Menos de 100 g/día

30.3 110-200 g/día

30.4 Más de 210 g/día

31.- ¿Cuánto alcohol consume a la semana?

31.1 No

31.2 Menos de 6 latas (menos de ¼ de botella)

31.3 Más de 6 latas (más de ¼ de botella)

31.4 Más de 12 latas (más de 1/2 de botella)

31.5. Años tomando: _____

31.6. Tiempo sin tomar: _____

32. Tomando en cuenta diversas formas de actividad física, (trote, carrera, bicicleta, natación) ¿usted le dedicas de 90 minutos en total por semana?

32.1 Sí _____ 32.2 No _____

*Estas son todas las preguntas
Muchas gracias por su participación*

Nombre y firma de quien realizó la encuesta: _____

Fecha de obtención de la muestra: Día _____ Mes: _____ Año _____

ANEXO 2

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 desnaturizante de los detergentes SDS y Tritón X-100. Las proteínas desnaturizadas son extraídas con fenol y Sevag. Al centrifugarlas forman una capa 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 isoamílico, 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 μL de sangre periférica anticoagulada con EDTA y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 mL.
2. Agregar 200 μL de buffer de lisis TSNT y mezclar por inversión.
3. Agregar 500 μL de fenol saturado. Mezclar por inversión.
4. Agregar 100 μL 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 μL 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 μL 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 μL de TE, el volumen dependerá del tamaño de la pastilla. Resuspender completamente la pastilla de ADN agitando suavemente el fondo del tubo.

Referencias

Sambrook y Russell. Molecular cloning. En: Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA. New York. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 2001. p. 6.28-6.30.