

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR



*Valor de los polimorfismos de los genes
CHRNA3A5B4 en la adicción al tabaco. Influencia de
los mismos en el proceso de adicción.*

María José Bernabé Barrios

Salamanca 2012

**DON MIGUEL BARRUECO FERRERO, PROFESOR TITULAR
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA**

**DON ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA**

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Valor de los polimorfismos de los genes CHRNA3A5B4 en la adicción al tabaco. Influencia de los mismos en el proceso de adicción”, que presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía Doña María José Bernabé Barrios, ha sido realizado bajo nuestra dirección conjunta en el Departamento de Medicina y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Salamanca a 25 de Enero del 2012.

Fdo: Dr. Miguel Barrueco Ferrero

Fdo: Dr. Rogelio González Sarmiento

*“A mi futuro esposo,
Arturo”*

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Miguel Barrueco Ferrero y Rogelio González Sarmiento, directores de este trabajo, por su generosidad al brindarme sus conocimientos, sus orientaciones, su paciencia, su constante esfuerzo, dedicación y confianza depositada durante estos años. Gracias a ellos, a su impulso y su ánimo este trabajo ha podido ser realizado.

A Amparo Pertierra, una de las personas más buenas que jamás he conocido, que desde el primer momento me ofreció todo su apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés.

Al doctor Miguel Torrecilla y a las doctoras Rosa Casado y Carmen Tabera, quienes se prestaron desinteresadamente a ayudarme para conseguir controles para el estudio.

A Pilar Corredera, enfermera de la UCAI, y al Servicio de Prevención de Riesgos laborales, que sin su ayuda no hubiera podido conseguir todos los controles de esta tesis.

A Mercedes Barba por su predisposición y colaboración en realizar los análisis estadísticos de este trabajo de investigación pese a la distancia.

A Clara Cieza por introducirme en el mundo del laboratorio y por su siempre permanente disposición, optimismo y desinteresada ayuda.

A todos los compañeros de Departamento de Medicina Molecular por brindarme todo su apoyo y tantas facilidades, y en especial a Nieves Mateos que le ha supuesto un sobreesfuerzo, ya que ha sido un trabajo añadido al que diariamente tenía.

A los pacientes y personas sanas que se prestaron voluntarios para la realización del estudio.

A mis padres, por enseñarme el amor al trabajo y la constancia, virtudes imprescindibles en la realización de este estudio, y a toda mi familia, incluyendo mis futuros suegros, por intentar siempre comprenderme.

A mi novio Arturo, por su apoyo incondicional, por estar a mi lado con su comprensión y cariño durante todo este tiempo.

A aquellos compañeros de trabajo que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	11
INTRODUCCIÓN	21
1.- Implicaciones genéticas en la dependencia nicotínica	21
2.- Modelos genéticos.....	22
2.1.- Estudios poblacionales en gemelos	22
2.2.- Estudios en animales	24
2.2.1.- Cepas consanguíneas	25
2.2.2.- Animales transgénicos y Knock-out.....	25
3.- Genoma, polimorfismos del DNA y mutaciones genéticas	26
4.- Genes y polimorfismos relacionados con el consumo de tabaco	27
4.1.- Genes relacionados con el metabolismo de la nicotina	27
4.2.- Genes relacionados con las vías cerebrales de la adicción a la nicotina.....	29
4.2.1.- Sistema catecolaminérgico.....	30
4.2.1.1.- Genes relacionados con los receptores dopaminérgicos.....	31
4.2.1.2.- Gen transportador de la dopamina	32
4.2.1.3.- Genes relacionados con el metabolismo de la dopamina ...	33
4.2.2.- Sistema serotoninérgico	35
4.2.2.1.- Gen de la enzima triptofano hidroxilasa (TPH)	35
4.2.2.2.- Gen de la proteína transportadora de la serotonina.....	35
4.2.2.3.- Gen del receptor de serotonina.....	36
4.2.3.- Sistema noradrenérgico	36
4.2.4.- Sistema glutamatergico	37
4.2.5.- Sistema opioide	38
4.2.6.- Sistema cannabinoide	39
4.2.7.- Óxido nítrico	40
4.2.8.- Receptores del gusto.....	40
4.2.9.- Sistema colinérgico	40
4.2.9.1.- Patologías relacionadas con los receptores nicotínicos	50
4.2.9.2.- Receptores nicotínicos y alcohol.....	54
4.2.9.3.- Receptores nicotínicos y edad de consumo.....	54
4.2.9.4.- Receptores nicotínicos y embarazo	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
1.- Hipótesis.....	59
2.- Objetivos.....	59

PACIENTES Y MÉTODOS	61
1.- Pacientes	63
2.- Variables	63
3.- Métodos	64
3.1.- Control y seguimiento de los sujetos incluidos en el estudio	64
3.2.- Extracción del DNA de sangre periférica	65
3.2.1.- Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.	65
3.2.2.- Purificación del DNA.....	65
3.2.3.- Cuantificación del DNA.....	66
3.3.- Amplificación de DNA mediante PCR cuantitativa	66
4.- Estudio de los polimorfismos de los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4.	67
5.- Estudio estadístico	69
RESULTADOS	71
1.- Características de los sujetos incluidos en el estudio.....	73
2.- Análisis del gen CHRNA3.....	75
2.1.- Estudio comparativo del gen CHRNA3 entre fumadores y no fumadores	75
2.2.- Estudio del gen CHRNA3 para las variables de género y edad.....	76
2.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo.....	78
2.4.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad.	80
3.- Análisis del gen CHRNA5.....	83
3.1.- Estudio comparativo del gen CHRNA5 entre fumadores y no fumadores	83
3.2.- Estudio del gen CHRNA5 para las variables de género y edad.....	84
3.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo.....	87
3.4.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad.	88
4.- Análisis del gen CHRNB4.....	91
4.1.- Estudio comparativo del gen CHRNB4 entre fumadores y no fumadores	91
4.2.- Estudio del gen CHRNB4 para las variables de género y edad.....	92
4.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo.....	95
4.4.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad.	96

DISCUSIÓN	99
1.- Generalidades	101
2.- Análisis de las características de los sujetos incluidos en el estudio. ...	102
3.- Características de los genes colinérgicos a estudio	105
4.- Estudio de los genes para las variables de género y edad.....	112
4.1.- Género	112
4.2.- Edad.....	117
4.3.- Modelos de herencia.....	120
5.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el género.	121
6.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad.	123
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ABREVIATURAS	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metabolismo de la nicotina.....	28
Figura 2.- Efectos de la nicotina sobre la neurotransmisión dopaminérgica	34
Figura 3.- Estructura del nAChR. ...	43
Figura 4.- Representación esquemática de la estructura genómica del bucle formado por los genes CHRNA5/A3/B4..	48
Figura 5.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen CHRNA3 en controles.	67
Figura 6.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen CHRNA5 en controles.	68
Figura 7.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen CHRNB4 en controles.	69
Figura 8.- Porcentajes de fumadores y no fumadores en función de la edad y el género	74
Figura 9.- Modelos de la epidemia tabáquica según López et al.....	104
Figura 10.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\alpha 3$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNA3)..	106
Figura 11.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\alpha 5$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNA5)..	106
Figura 12.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\beta 4$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNB4)..	106
Figura 13.- Porcentajes de frecuencias alélicas del gen CHRNA3 en controles y fumadores.	107
Figura 14.- Porcentajes de frecuencias genotípicas del gen CHRNA3 en controles y fumadores.	108
Figura 15.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen CHRNA3 en el grupo de fumadores.	108
Figura 16.- Porcentajes de las frecuencias alélicas del gen CHRNA5 en controles y fumadores.	109
Figura 17.- Porcentajes de las frecuencias genotípicas del gen CHRNA5 en controles y fumadores.	109
Figura 18.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen CHRNA5 en el grupo de fumadores.	110
Figura 19.- Porcentajes de las frecuencias alélicas del gen CHRNB4 en controles y fumadores.	111
Figura 20.- Porcentajes de las frecuencias genotípicas del gen CHRNB4 en controles y fumadores.	111
Figura 21.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen CHRNB4 en fumadores.	112
Figura 22 .- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA3 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (A, B).....	113
Figura 23.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA5 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (C, D).	113
Figura 24.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNB4 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (E,F).	114
Figura 25.- Análisis de los efectos aleatorios en fumadores por fMRI.....	116
Figura 26 .- Reactividad de los fumadores homocigotos medida por fMRI ...	117
Figura 27 .- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA3 para el grupo control y fumadores para la variable edad (G, H).....	118

Figura 28.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA5 para el grupo control y fumadores para la variable edad (I, J).	118
Figura 29.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA4 para el grupo control y fumadores para la variable edad (K, L).....	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características de los controles y de los casos.....	73
Tabla 2.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles).	75
Tabla 3.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.	76
Tabla 4 .- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.	77
Tabla 5.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.	78
Tabla 6.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA3 en función del modelo de herencia.....	78
Tabla 7.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.	79
Tabla 8.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.	79
Tabla 9.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA3 en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.	80
Tabla 10.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.	81
Tabla 11.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA3 en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad	82
Tabla 12.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles).	83
Tabla 13.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.	84
Tabla 14.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.	85
Tabla 15.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.	86
Tabla 16.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA5 en función del modelo de herencia.....	86
Tabla 17.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.	87
Tabla 18.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.	87
Tabla 19.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA5 en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.	88

Tabla 20.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.	89
Tabla 21.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA5 en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad	90
Tabla 22.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles)	91
Tabla 23.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.	92
Tabla 24.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.	93
Tabla 25.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.	94
Tabla 26.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA4 en función del modelo de herencia.....	94
Tabla 27.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.	95
Tabla 28.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.	95
Tabla 29.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA4 en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.	96
Tabla 30.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.	97
Tabla 31.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA4 en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad	98

INTRODUCCIÓN

1.- Implicaciones genéticas en la dependencia nicotínica

La contribución de aspectos genéticos a la conducta de las personas ante el tabaco es objeto de investigación desde hace décadas, existiendo algunas evidencias consistentes. Diferentes estudios poblacionales realizados en muestras poblacionales muy amplias, incluyendo series familiares con subgrupos de hermanos gemelos o de adopción, han demostrado que los factores genéticos de la herencia pueden tener un importante papel en la dependencia a la nicotina.

La incidencia del factor genético como determinante del consumo de tabaco fue evaluada por primera vez por Fisher et al en 1959¹, quienes señalaron la posibilidad de la existencia de una relación entre genotipo, consumo de tabaco y cáncer de pulmón, sugiriendo la existencia de genes que durante la juventud predispondrían a las personas a ser fumadoras y que más tarde, durante la edad adulta, podrían favorecer el desarrollo de cáncer de pulmón. Así, aunque inicialmente más ligado a la búsqueda del factor genético que relacionase tabaco y cáncer de pulmón, Fisher puso en marcha también el interés por descubrir la influencia del genotipo en el inicio, la consolidación y el mantenimiento del consumo de tabaco.

Durante la última década del siglo XX aumentó espectacularmente el interés por conocer las relaciones existentes entre genotipo, fenotipo, y consumo de tabaco, y estas investigaciones han ido permitiendo esclarecer algunos de los mecanismos implicados en el desarrollo y mantenimiento del consumo de tabaco. En la actualidad, y tras corregir algunos de los argumentos de Fisher, se conoce que las bases genéticas de la susceptibilidad a la dependencia nicotínica y la predisposición a padecer cáncer de pulmón son aspectos diferentes. Por otra parte, los avances cada vez mayores en el estudio de los mecanismos implicados en la carcinogénesis^{2,3} y en las enfermedades cardiovasculares⁴, y respiratorias⁵ han permitido establecer una asociación entre éstas enfermedades y el consumo de tabaco, en la que la susceptibilidad genética desempeña también un papel relevante.

Aunque factores ambientales como la influencia de los compañeros y la publicidad pueden contribuir al inicio al consumo de tabaco, un determinante del uso continuo de tabaco es la dependencia nicotínica⁶. La investigación clínica ha puesto de relieve la existencia de diferencias individuales en la capacidad de las personas de convertirse en dependientes de la nicotina y en su capacidad para dejar de fumar posteriormente. Aunque las causas hereditarias de tales variaciones fueron sugeridas hace más de cuarenta años¹, los avances en la genética del comportamiento y la biología molecular han renovado el atractivo existente en la investigación de las bases genéticas de la dependencia a la nicotina.

El interés por descubrir el papel de la herencia y de los comportamientos sociales (estilos de vida, exposición del medio familiar al humo del tabaco,

actitud familiar ante el tabaco,...) en el desarrollo del tabaquismo ha dado lugar a estudios de agrupación familiar que tratan de investigar el peso que pueda tener la genética y conducta adquirida, genotipo y fenotipo. Los estudios iniciales se llevaron a cabo mediante estudios comparativos entre distintos grupos y subgrupos de población. La mayoría de estos estudios se realizaron en cohortes de gemelos, buscando factores ambientales que pudieran influir sobre una misma base genética. Asimismo, se investigó la influencia que el sexo o la etnia pueden tener en la adquisición y el mantenimiento de la dependencia nicotínica. Estos estudios constituyen la base de partida de las investigaciones sobre el papel de la herencia genética en los fumadores.

2.- Modelos genéticos

El consumo de tabaco es un comportamiento complejo, multifactorial, con determinantes tanto genéticos como ambientales. Existen diferentes enfoques para intentar comprender las contribuciones genéticas al hecho de fumar: (A) el estudio de individuos que comparten genes; que incluye estudios familiares en gemelos y en hermanos de adopción; (B) estudios de asociación, estudios de casos y controles; (C) estudios con animales, análisis de animales consanguíneos, animales transgénicos y animales con genes Knock-out; éstos ofrecen la ventaja de poder estudiar gran número de animales genéticamente idénticos en condiciones controladas; (D) el análisis de ligamiento, el estudio del patrón de la herencia de los fenotipos y la genealogía. El desarrollo de modelos matemáticos sofisticados para el análisis de datos genéticos, ha permitido la evaluación de la importancia relativa de las contribuciones tanto genéticas como ambientales y está contribuyendo al desarrollo de este tipo de estudios.

2.1.- Estudios poblacionales en gemelos

Los estudios en gemelos han sido utilizados durante muchos años para examinar la genética poblacional en la causa de enfermedades. Los estudios en gemelos suelen examinar las tasas de concordancia para los rangos de interés. Si la proporción de gemelos monocigotos concordantes para un rasgo dado es mayor que la proporción de gemelos dicigotos, es probable que los genes influyan en el carácter. Si no hay diferencia significativa en las tasas de concordancia entre gemelos monocigotos y dicigotos, entonces el rasgo probablemente se vea influenciado por factores ambientales. Fue Fisher, en 1958¹, quién informó por primera vez en un trabajo llevado a cabo con gemelos varones monocigotos y dicigotos alemanes, que la concordancia de fumadores era mayor entre los gemelos monocigotos que entre los dicigotos. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente entre gemelos femeninos de Alemania⁷ y replicado en los estudios de los Estados Unidos, los países escandinavos, Australia, Gran Bretaña y Japón en las poblaciones de adultos, de ancianos, y de fumadores adolescentes⁸⁻²⁰. Aunque los estudios iniciales sugirieron una modesta influencia de la herencia en el hecho de fumar, estudios más recientes han incluido muestras de mayor tamaño y modelos de análisis de datos más sofisticados. Estos estudios han encontrado importantes

influencias genéticas sobre varios aspectos relacionados con la conducta de fumar, tanto en el inicio^{10,12} como en la persistencia del consumo y la intensidad del mismo (número de cigarrillos)¹⁴ en hombres y en mujeres^{8,17}.

Las estimaciones del peso de la herencia para llegar a ser fumador en distintos estudios varían desde un 46% hasta un 84%, margen comparable con las estimaciones de heredabilidad para otras enfermedades como el asma, la hipertensión o el alcoholismo^{11,13,15,19}. Estudios realizados por Carmelli et al^{8,9} en 4.960 parejas de gemelos varones seguidos durante 16 años, permitieron observar una mayor concordancia entre gemelos monocigotos que entre los dicigotos en todos los grupos estudiados (no fumadores, fumadores activos y exfumadores). Kendler y cols. estudiaron 1.898 gemelas en un esfuerzo por identificar factores de riesgo para el inicio y la dependencia tabáquica, encontrando una asociación al inicio con el bajo nivel educativo, la religiosidad, el aumento de neuroticismo y la extroversión, mientras que la dependencia nicotínica se asoció a la baja autoestima, nivel educativo, extroversión, historia de trastornos de ánimo y abuso de alcohol¹⁵. Un metanálisis posterior, donde se analizaban más de 17.500 gemelos provenientes de 14 estudios diferentes, que habían sido educados juntos, permitió demostrar más claramente la influencia de factores genéticos, el comportamiento familiar y los factores individuales en fumadores regulares, representando el 56%, 24% y el 20% de la varianza respectivamente¹⁷.

Los estudios en gemelos que habían sido educados por separado también han encontrado que los factores genéticos contribuyen en aproximadamente un 60% a la conducta fumadora²¹. En relación con la iniciación del consumo, Eaves y Eysenck²² señalaron que el inicio al consumo se da a menudo más entre hermanos biológicos que entre hermanos adoptivos, lo que sugiere un mayor peso de la genética que de los factores ambientales^{8,9,11,14}. Ello ha permitido pensar a numerosos investigadores que tanto el medio ambiental como los factores hereditarios pueden coexistir, y que esta coexistencia es muy difícil de separar, creando un factor de confusión o sesgo en los estudios realizados en gemelos. Para evitar este problema Osler y sus colaboradores realizaron un estudio con 850 familias con hijos adoptados encontrando una asociación mayor entre fumadores que habían sido adoptados y sus hermanos biológicos, y entre fumadoras adoptadas y sus madres biológicas, aunque hubieran sido educados por separado²³. Esta asociación apoya los resultados de los estudios realizados previamente en gemelos y refuerza la idea de que existe una influencia genética en la actitud personal frente al inicio al consumo de tabaco²⁴.

Existen genes que también contribuyen al mantenimiento a largo plazo del consumo de tabaco²⁵. Parece que puede haber factores genéticos que influyen tanto en la iniciación como en el mantenimiento del tabaquismo y algunos que son exclusivos de uno u otro aspecto de la conducta fumadora^{13,15}. Aunque se ha señalado que los genes que contribuyen al mantenimiento del consumo lo hacen reduciendo las posibilidades de abandono del tabaco, este último aspecto y su relación con la mayor o menor intensidad del síndrome de abstinencia no es aún suficientemente conocido. Xian et al.²⁶ señalan que la

influencia de los genes supone una contribución significativa en el fallo de los intentos de abandono y en la severidad del síndrome de abstinencia, lo que parece relacionar ambos aspectos con la influencia genética en la dificultad para abandonar el consumo de tabaco una vez iniciado. Para estimar la heredabilidad, Xian y sus colaboradores estudiaron 1818 parejas de gemelos fumadores que habían realizado al menos un intento fallido de abandono del tabaquismo; encontraron que la influencia genética representaba un 54% de la varianza del riesgo para fracasar en los intentos de abandono, y un 29,7% para mantenerse abstinentes²⁶. Durante los últimos años se ha establecido una relación entre los fallos en los intentos de abandono y la intensidad del síndrome de abstinencia, por lo que la variabilidad individual en la intensidad del síndrome de abstinencia y su relación con los fracasos en los intentos de abandono siguen siendo objeto de estudio. Algunos autores describen una relación lineal entre la severidad del síndrome de abstinencia y los intentos fallidos de abandono del tabaco²⁷.

Para examinar el efecto de las influencias genéticas, en algunos estudios se emplean las tasas de concordancia global (OCR), que estiman la diferencia de concordancia entre monocigotos y dicigotos. Si dicha tasa es superior a 1, se considera una posible influencia genética, obteniendo la mayoría de los artículos tasas globales situadas entre 1,3 y 1,6, lo que indica un efecto moderado de los factores genéticos en el comportamiento personal ante el tabaco^{8,9,11,14}.

A pesar de que los estudios poblacionales realizados en gemelos parecen indicar que factores genéticos contribuyen al consumo de tabaco, los resultados de estos estudios están limitados por el supuesto de que los gemelos monocigotos y dicigotos están por igual expuestos a las mismas condiciones ambientales. Por ello algunos autores señalan que los gemelos monocigotos pueden compartir un entorno más similar que los gemelos dicigotos, lo que puede sobrevalorar el índice de heredabilidad^{28,29}, siendo por ello necesario realizar otro tipo de estudios.

2.2.- Estudios en animales

Debido a que los estudios en seres humanos no permiten la manipulación de genes individuales y de productos de los genes, los experimentos en animales permiten examinar la influencia biológica de genes específicos para la adicción a la nicotina. Se han realizado múltiples estudios en animales que han permitido comprender de forma más amplia la dependencia a la nicotina. Los estudios más útiles han sido aquellos realizados con cepas de animales consanguíneos, transgénicos y en animales con genes Knock-out.

2.2.1.- Cepas consanguíneas

Las cepas consanguíneas se producen tras el apareamiento de los miembros de una familia dentro de la misma familia, de tal manera que los animales son homocigotos para todos los locus de un gen. Por lo tanto, los miembros de una cepa consanguínea son genéticamente idénticos. En una serie de experimentos Morrison Lee³⁰, Hatchell y Collins³¹, y Robinson et al.³² demostraron que las diferentes cepas de animales consanguíneos difieren en su sensibilidad ante los comportamientos y efectos fisiológicos de la nicotina, incluyendo el desarrollo de tolerancia y sensibilidad a efectos adversos tales como las convulsiones inducidas por la nicotina³⁰⁻³².

Por otro lado, factores genéticos parecen determinar el número de receptores nicotínicos cerebrales que median los efectos de la nicotina³³. Estas diferencias observadas entre las cepas de animales consanguíneos apoyan la hipótesis de que determinados factores genéticos pueden contribuir a determinar también las diferencias en la susceptibilidad a la dependencia nicotínica entre los humanos.

2.2.2.- Animales transgénicos y Knock-out

El objetivo de llevar a cabo estudios en animales Knock-out es reemplazar genes específicos de interés para un estudio determinado por otros inactivos o alterados; el déficit bioquímico observado en estos animales puede revelar la función de la proteína expresada por el gen objeto de estudio. Picciotto et al.³⁴ en un trabajo llevado a cabo en ratones Knock-out, demostraron que la subunidad $\beta 2$ del receptor neuronal de la acetilcolina puede mediar las propiedades reforzantes de la nicotina, mientras que la subunidad $\alpha 7$ puede ser un importante mediador de las acciones nicotínicas en el hipocampo³⁵.

Existen otros modelos de ingeniería genética donde un segmento de DNA de un organismo de diferente especie, se introduce en una línea germinal animal, permitiendo examinar los receptores específicos que puedan mediar las propiedades adictivas de la nicotina. Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan la tirosina-hidroxilasa (TH), un enzima limitante de la síntesis de la dopamina, parecen ser menos sensibles a los efectos fisiológicos de la nicotina³⁶. Se ha demostrado que la nicotina aumenta la expresión de la tirosina-hidroxilasa (TH) en los modelos de cultivos celulares, lo cual puede indicar que los mecanismos dopaminérgicos pueden ser importantes mediadores de los efectos centrales de la nicotina³⁷.

Estos estudios realizados en animales tienen también importantes limitaciones ya que la manipulación experimental de un gen puede producir cambios fenotípicos insospechados que limitan la validez de los estudios en animales y su posible aplicabilidad a humanos.

3.- Genoma, polimorfismos del DNA y mutaciones genéticas

El gran avance en las técnicas de genética molecular han permitido desvelar la secuencia del genoma humano^{38,39} permitiendo caracterizar cada vez más rápidamente los genes que codifican las proteínas implicadas en los mecanismos adictivos a las drogas en general, y a la nicotina en particular. El mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el tabaquismo debería conducir al desarrollo de terapias farmacológicas más personalizadas⁴⁰, lo que constituye hoy día un objetivo prioritario de la investigación.

La base estructural del genoma humano es el ácido desoxirribonucleico (DNA). La única función del genoma es transmitir información para la síntesis de proteínas de una generación a otra. La información para la síntesis de proteínas está contenida en unas unidades dentro del DNA, que denominamos genes y que están formados por nucleótidos. Al analizar el genoma humano se ha comprobado que alrededor del 90% de los nucleótidos no contiene información para la síntesis de proteínas, es decir, no forman parte de los genes, o lo que es lo mismo, que los genes ocupan menos del 10% del genoma humano.

Por otro lado, la secuencia de nucleótidos del DNA es dinámica y cambia de generación en generación. Estos cambios se denominan mutaciones y se producen por errores de la enzima encargada de duplicar el DNA cada vez que la célula se divide (DNA polimerasa), o por la acción de genes ambientales como la luz ultravioleta del sol o determinados agentes ambientales contaminantes. La mayoría de estas mutaciones no suelen modificar las proteínas del individuo y, por tanto, no tienen repercusión, ya que los genes constituyen menos del 10% del DNA. Si las mutaciones tienen lugar en genes que codifican proteínas imprescindibles para el correcto funcionamiento de las células, aparecen las enfermedades hereditarias y, cuando estas mutaciones aparecen en las células de un individuo adulto, pueden ser las responsables de la aparición de cáncer.

Una misma región del genoma puede presentar en individuos diferentes, distintos nucleótidos en una misma posición, denominándose este hecho como polimorfismo. Los polimorfismos pueden encontrarse en los genes o en regiones intergénicas. Durante la meiosis tiene lugar un entrecruzamiento entre los cromosomas que permite el intercambio de material genético entre los dos cromosomas homólogos. Este intercambio de material genético supone que las regiones del genoma más próximas entre sí tienen más posibilidades de mantenerse juntas (no se asocian al azar), lo que se denomina desequilibrio de ligamentos. Así, algunos polimorfismos localizados fuera de los genes se heredan ligados a los mismos, de manera que, al estudiar los polimorfismos se estudian indirectamente los genes próximos. Por otra parte, algunos de los polimorfismos localizados fuera de los genes se asocian con cambios muy sutiles de la función de la proteína, de manera que su repercusión en el individuo es muy pequeña y sólo cuando se asocian varios cambios (varios polimorfismos) podemos detectar alteraciones en el fenotipo.

4.- Genes y polimorfismos relacionados con el consumo de tabaco

Los progresos en el campo de la genética, el conocimiento completo del genoma humano y los avances en tecnología genética, han permitido la localización e identificación de los genes que predisponen a comenzar a fumar y a la dependencia nicotínica.

Con el estudio de pares de hermanos, y analizando sus características de fumador o no fumador y el número de paquetes-año que consumían los fumadores, se han llegado a relacionar algunos genes con el establecimiento y mantenimiento del tabaquismo. Así, se considera que algunas regiones de los cromosomas 6, 9, y 14 están relacionadas con la mayor vulnerabilidad (predisposición) al tabaco y al alcohol⁴¹. Otros estudios refieren que la herencia relacionada con el tabaco se localiza en el cromosoma 5q, que además, no está lejos del locus del receptor de la dopamina D1⁴², y con menor evidencia con los cromosomas 4, 15, y 17, aunque estos datos no son concluyentes.

La caracterización de los nuevos polimorfismos del genoma (SNP, VNTR, STR, etc.) está permitiendo asociar determinadas regiones cromosómicas con determinados caracteres fenotípicos. Así, diferentes estudios llevados a cabo hasta el momento han permitido localizar varias regiones del genoma, en los cromosomas 2, 5, 9, 11, 17, 19, 22 y X que podrían estar implicadas en el metabolismo de la nicotina y la adicción al tabaco⁴⁰.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha se han centrado tanto en aspectos relacionados con el metabolismo de la nicotina como en aspectos relacionados con la actuación de la misma a nivel del sistema nervioso central y su papel en relación con los neurotransmisores y los receptores cerebrales.

4.1.- Genes relacionados con el metabolismo de la nicotina

La nicotina es metabolizada en su mayor parte por C-oxidación a cotinina y, en menor medida, por N-oxidación, N-demetilación y N-glucuronidación. El metabolito principal o cotinina es también metabolizado por hidroxilación, N-oxidación y N-glucuronidación.

Se han observado diferencias en el aclaramiento de nicotina, que es menor en fumadores que en no fumadores y en determinados grupos étnicos; por el contrario, en mujeres embarazadas el aclaramiento es mayor. No se han observado diferencias en función de la edad o el sexo.

Los procesos de metabolización tiene lugar sobre todo en el hígado por medio de un grupo de enzimas de la familia de los citocromos P-450 (CYP) que actúan catalizando la conversión de nicotina a cotinina⁴³. Dentro del grupo de enzimas CYP, los más relacionados con el metabolismo de la nicotina son el CYP2A6 y el CYP2D6 y posiblemente el CYP2B6⁴⁴. Variaciones en los genes que codifican estos enzimas pueden determinar diferencias en el

comportamiento ante el tabaco de las personas portadoras de dichos polimorfismos.

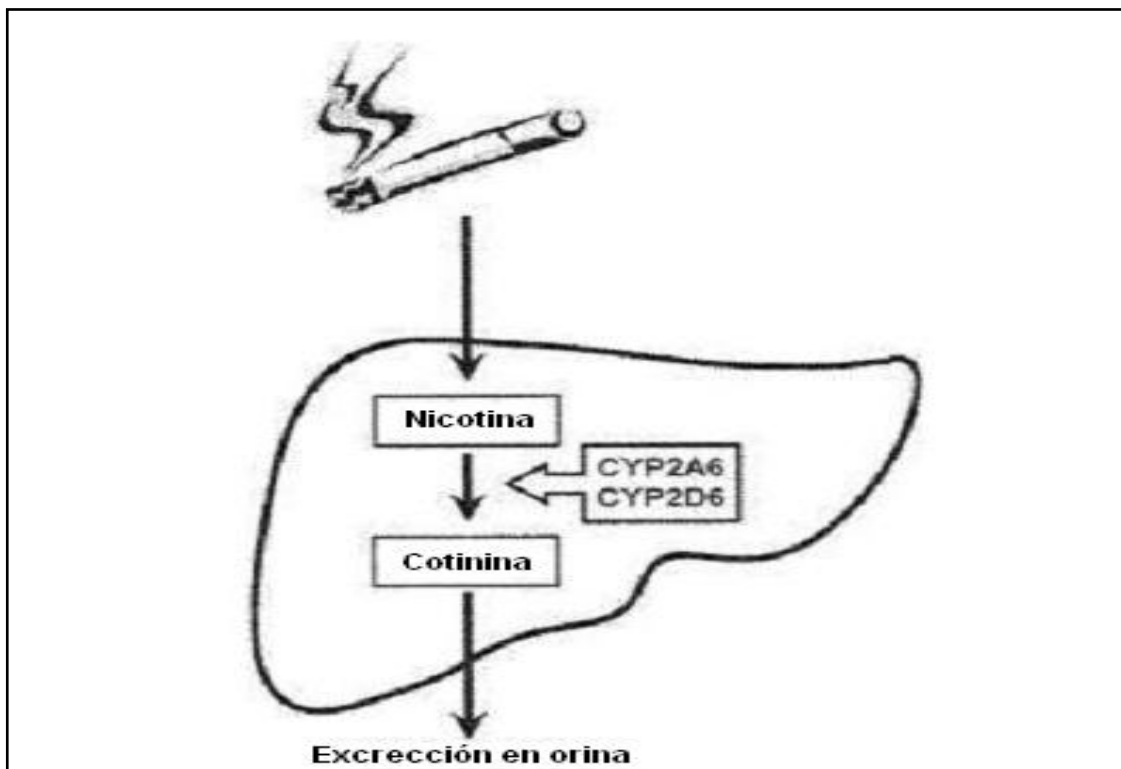


Figura 1.- Metabolismo de la nicotina. La nicotina se metaboliza en el hígado por el grupo de enzimas del CYP. Estudios genéticos han investigado la asociación entre el tabaquismo y los polimorfismos de los genes que codifican para estas enzimas, en particular CYP2A6 y CYP2D6⁴⁵.

El gen CYP2A6 está localizado en el cromosoma 19q12-13.2⁴⁸ del que se han identificado tres variantes: una variante normal, el CYP2A61, y otras dos variantes asociadas con una actividad reducida, el CYP2A62 y CYP2A63. Pianezza et al.⁴⁹ informaron de que la frecuencia de individuos con variantes anormales del enzima CYP2A6 (es decir, el CYP2A62 y CYP2A63) fue significativamente menor entre las personas dependientes de la nicotina que en sujetos control. Los individuos fumadores que portan dichas variantes anormales, fumaban menos cigarrillos al día y tenían mayores probabilidades de éxito en el abandono del tabaco, lo que confiere un carácter protector al CYP2A62 y CYP2A63 frente a la dependencia de la nicotina⁴⁴. También se ha descubierto que el CYP2A6 activa sustancias procarcinógenas del tabaco, lo que puede suponer un aumento del riesgo para padecer cáncer^{50,51} y mantiene abierta la hipótesis de que puedan existir determinadas relaciones con los mismos genes que estarían implicados tanto en el consumo de tabaco como el desarrollo el cáncer de pulmón.

Otros enzimas que intervienen en el metabolismo de la nicotina incluyen los enzimas CYP2B6 y CYP2D6, aunque sus contribuciones son de menor importancia^{46,52}.

La enzima derivada del Citocromo P-450, CYP2D6, también está involucrada en la oxidación de la nicotina a cotinina. Los individuos que heredan alelos defectuosos del gen CYP2D6, que corresponden a las variantes *3, *4, *5 y *16, tienen una menor capacidad para metabolizar drogas y se les denomina *metabolizadores lentos*^{53,54}, lo que ocurre en un 3-10% de la población caucásica. Si tiene uno o dos de los alelos normales, *1 y *2, se les denomina *metabolizadores rápidos*, y los que tienen más de dos copias de los alelos normales se les denomina *metabolizadores ultrarrápidos*, lo que ocurre entre el 1 y el 2% de los caucásicos⁵⁵.

Turgeon et al.⁵⁶ señalaron que los metabolizadores lentos estaban poco representados entre los fumadores en comparación con los no fumadores, apoyando la hipótesis de que los individuos que metabolizan la nicotina lentamente tienen menos posibilidades de volverse adictos. Sin embargo, Cholerton et al.⁵⁷ no encontraron una diferencia en el genotipo CYP2D6 entre fumadores y no fumadores. Por otro lado, recientemente el mismo grupo de trabajo ha llegado a la conclusión de que, aunque el estado de CYP2D6 no influye en si una persona se convierte en un fumador, una vez que un individuo comienza a fumar, la dependencia a la nicotina si puede verse influida por su genotipo CYP2D6⁵⁸. En un estudio llevado a cabo por Saarikoski⁵⁹, se observó que la prevalencia de metabolizadores ultrarrápidos en los fumadores importantes era de cuatro veces mayor que en los no fumadores. Aunque se intentó asociar el genotipo de los metabolizadores lentos con un menor riesgo de padecer cáncer de pulmón, trabajos más recientes no han demostrado diferencias significativas en la probabilidad de padecer cáncer de pulmón entre las distintas variantes del gen CYP2D6^{60,61}. Existen estudios con resultados contradictorios entre el riesgo asociado para el desarrollo de enfermedades relacionadas con el tabaco y las distintas variantes del gen CYP2D6⁶¹⁻⁶⁴, por lo que no se ha podido llegar a conclusiones importantes.

También se ha señalado que el gen CYP2B6 se asocia con mayor vulnerabilidad a los síntomas de abstinencia y a las recaídas, presentando incluso diferencias en los resultados respecto al sexo⁶⁵. Un aumento de la actividad del enzima CYP2B6, en fumadores y alcohólicos puede alterar la sensibilidad central de las drogas y contribuir a desarrollar tolerancia a la nicotina⁶⁶.

Las investigaciones sobre el papel del metabolismo de la nicotina en la adicción al tabaco y la importancia que determinados polimorfismos de genes relacionados con dicho metabolismo puedan tener siguen abiertas.

4.2.- Genes relacionados con las vías cerebrales de la adicción a la nicotina

La nicotina actúa en el Sistema Nervioso Central sobre receptores neuronales interfiriendo y modificando diferentes sistemas de neurotransmisión. Estos receptores, presentes en distintas áreas cerebrales forman parte de distintos sistemas neuronales. En la actualidad se dispone de abundante información sobre algunas de las vías neuronales implicadas en la adicción a la

nicotina. Se conoce que los efectos placenteros derivados del consumo están estrechamente ligados a la estimulación de las vías dopaminérgicas cerebrales y, aunque estas vías y sus funciones no se conocen del todo, se considera que son comunes total o parcialmente a otras drogas, como la cocaína, los opiáceos, el cannabis y el alcohol⁶⁷.

La vía dopaminérgica más implicada en los mecanismos de adicción a la nicotina es la mesolímbica, que se origina en el área tegmental ventral y se prolonga hasta el núcleo accumbens y la corteza frontal. Las proyecciones desde el área tegmental ventral se dirigen hacia estructuras límbicas, como el núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo y se asocian al reforzamiento de los efectos de la droga sobre la memoria y al deseo de consumir la droga, junto a los cambios anímicos asociados al síndrome de abstinencia que se produce por carencia de la misma. Además, las proyecciones que se dirigen hacia la corteza cerebral prefrontal, orbitofrontal y del cíngulo anterior se asociarían a las vivencias generadas por su consumo y la necesidad de seguir consumiéndola. También se conoce que hay conexiones entre las neuronas gabaérgicas del núcleo accumbens y el área tegmental ventral y que las proyecciones glutamérgicas del córtex frontal se asocian asimismo con el núcleo accumbens y el área tegmental ventral⁶⁸.

Otro circuito relacionado con la adicción a las drogas es la vía opioide, sobre la que también ejerce su efecto la nicotina. En modelos experimentales con animales se ha podido demostrar que este sistema interviene en la inhibición de la autoadministración de nicotina en modelos animales. Además de la dopamina, otros mediadores neuronales como la serotonina, la noradrenalina, el ácido gamma-amino-butírico (GABA) y el glutamato también han sido implicados en el mecanismo de la adicción a la nicotina⁶⁹, aunque su conocimiento es más incompleto.

El papel que juegan las interleucinas en los mecanismos de la adicción es también objeto de investigación. Un estudio reciente de Alonso Díaz⁷⁰ informa del papel que cumplen las interleucinas IL-1RN, IL-1B, IL-6 e IL-10 en la adicción a la nicotina.

4.2.1.- Sistema catecolaminérgico

Como hemos señalado anteriormente, los genes que regulan los flujos de dopamina en el sistema nervioso central son los más estudiados en relación con la adicción a la nicotina. Los mecanismos fisiopatológicos de la adicción se producen por activación de la vía mesolímbica y, en concreto, por un aumento de la secreción de dopamina en el núcleo accumbens, al igual que ocurre con otras drogas como la cocaína o la morfina⁶⁷⁻⁶⁹, y produce efectos placenteros, que constituyen el denominado sistema de recompensa, facilitando la repetición de dicha conducta y por tanto una nueva administración de la nicotina⁷¹. Se ha observado también un incremento de los valores de la L-DOPA en el núcleo caudado y en el putamen de los fumadores en relación con los no fumadores⁷².

4.2.1.1.- Genes relacionados con los receptores dopaminérgicos

Se conocen cinco receptores diferentes de dopamina –DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5–⁷³ y se han clonado los genes que los codifican, pero hasta el momento sólo se ha analizado una posible relación de la nicotina con los genes DRD1 y DRD2. Esto se debe principalmente a la falta de evidencia de que los polimorfismos de genes no estudiados no tengan un significado funcional o no estén asociados con trastornos psiquiátricos complejos⁷⁴.

En el gen DRD1 se han encontrado cuatro sitios polimorfos⁷⁵, y el análisis del polimorfismo que supone un cambio de adenina por guanina en la posición -48 (región promotora del gen) ha mostrado mayor frecuencia del alelo A entre fumadores que entre no fumadores, relacionándose con la intensidad del consumo de tabaco⁷⁶. El papel del gen del receptor de dopamina D1 ha sido investigado por Comings y colaboradores como parte de un estudio que examinó los genes de receptores dopaminérgicos entre fumadores, sujetos con el Síndrome de la Tourette y jugadores patológicos. En los tres grupos se observó un aumento significativo en la frecuencia de individuos con genotipo 1/1 o 2/2 en comparación con los sujetos control, lo que sugiere que puede existir una superposición en la susceptibilidad genética a conductas adictivas, posiblemente mediada por variantes alélicas del gen DRD1⁷⁶. Huang et al.⁷⁷ encontraron una asociación significativa entre la dependencia a la nicotina y un SNP (Nucleótido de polimorfismo único) en la región rs686 del gen DRD1 entre afroamericanos. En una muestra conjunta de afroamericanos y norteamericanos de origen europeo los SNPs en las regiones rs686 y rs4532 fueron asociados significativamente con la dependencia a la nicotina.

Blum et al.⁷⁸ describieron un polimorfismo a lo largo de un fragmento de restricción (TaqI) en la región no traducida 3' del receptor de dopamina D2 en el gen 11q.23, con cuatro alelos; DRD2 alelo A (*A1 y *A2) y DRD2 alelo B (*B1 y *B2). Otros estudios sugieren que existe un desequilibrio de ligamientos entre las variantes alélicas menos frecuentes A1 y B1⁷⁹⁻⁸¹. Existe una considerable variación de la frecuencia de estos alelos en diferentes grupos raciales y étnicos, incluso dentro de muestras europeo-africanas⁸². El estudio de un polimorfismo en la región 3' no codificante del gen DRD2⁸³ ha mostrado que el alelo DRD2-A1, aunque no modifica la proteína, se asocia con una menor disponibilidad de los receptores de dopamina en el cuerpo estriado, mientras que el alelo DRD2-A2 se asocia con mayores valores de dopamina⁸⁴.

Noble et al.⁸⁵ informaron por primera vez de la existencia de una mayor prevalencia del alelo DRD2-A1 entre fumadores activos y exfumadores en comparación con no fumadores. Estos resultados fueron replicados en un estudio de blancos no hispanos, donde se encontró que el 49% de los fumadores portaban el alelo A1, en comparación con el 26% en los sujetos control no fumadores⁸⁶. Se ha publicado también la existencia de una asociación inversa entre el alelo DRD2-A1 y la edad de comienzo al consumo de tabaco^{76,83-85}. Estas mismas relaciones también han sido observadas entre los fumadores mexicanos-americanos⁸⁷. Por ello se ha sugerido que los

individuos con el alelo *A1 pueden tener menor número de receptores de dopamina y menores sitios de unión al receptor⁸⁸, y pueden ser necesarias grandes cantidades de nicotina para aumentar la dopamina sináptica, y por tanto, desarrollar tolerancia a la nicotina rápidamente. Sin embargo, la validez de los primeros estudios de asociación ha sido cuestionados debido al potencial factor de confusión de “población heterogénea”, que sugiere la existencia de un factor étnico que modificaría los resultados de estos estudios. Así, los estudios de ligamento de Bierut y cols. no han podido demostrar una asociación entre el alelo *A1 y el consumo de tabaco⁸⁹.

Yoshida y cols.⁹⁰ encontraron en población japonesa una relación entre el alelo DRD2 *A2 y una mayor predisposición a fumar, al contrario de lo observado en la población caucásica, donde no se ha encontrado ninguna relación existente entre este polimorfismo y el tabaquismo⁹¹.

Shields et al.⁹² evaluaron la asociación entre el tabaquismo y las variantes alélicas L (Long) y S (Short) del gen del receptor DRD4, situado en el cromosoma 11p15.5. El estudio encontró que los individuos africanos-americanos que portaban al menos un alelo L, tenían un riesgo más alto de fumar y de inicio al consumo a una edad más temprana que los individuos homocigotos para el alelo S. Esta asociación no se observó en blancos. Dado que el alelo L se ha asociado con el rasgo de la personalidad de “búsqueda de novedad”⁹³, los autores sugirieron que las diferencias étnicas de su estudio podrían haber sido relacionadas con las diferencias mediadas genéticamente por el rasgo que busca novedad entre los dos grupos étnicos. Se ha encontrado que los receptores D4 en el núcleo accumbens (el sistema de recompensa) pueden modular la transmisión excitatoria⁹⁴ y la sensibilización de estas vías⁹⁵.

En resumen, si bien se han observado asociaciones significativas entre el consumo de tabaco y determinados polimorfismos de los genes relacionados con los receptores dopaminérgicos, estos resultados son muy variables, implican a distintos genes, y raramente se han conseguido replicar los resultados publicados previamente por otros autores. Por ello es aún difícil precisar el papel de los genes reguladores de los receptores dopaminérgicos, aunque si parece claro que cumplen un papel en la dependencia de la nicotina.

4.2.1.2.- Gen transportador de la dopamina

La dopamina liberada en la sinapsis es recaptada en la misma mediante una proteína denominada DAT, que es el principal mecanismo para el aclaramiento de la dopamina en la sinapsis cerebral⁹⁶, codificada por el gen SLC6A3 en el cromosoma 5p15.3, que presenta polimorfismos relacionados con una mayor o menor disponibilidad de dopamina en la sinapsis. Se han descrito varios polimorfismos de este gen con un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), desde 3 hasta 1, en el extremo 3' de la región no traducida⁹⁷. La repetición del alelo 10 (A10) es la más común (cerca del 25% de la población europea, caucásica o afroamericana es portadora). Sin embargo, existen algunas variaciones regionales; A10 llega al 90% en

poblaciones asiáticas o de América del Sur, mientras que en determinados Estados de África predomina el alelo A7.

Aunque el polimorfismo no afecta al producto real de la proteína, puede afectar la localización del RNAm, la estabilidad de la transcripción, la regulación de la síntesis de proteínas, y su expresión⁹⁸. De hecho, el polimorfismo parece alterar la traducción de la proteína DAT y disminuir su disponibilidad⁹⁹⁻¹⁰¹. El polimorfismo SLC6A3*9 (una repetición de 40 pb que aparece entre una y nueve veces) localizado en la región '3 del gen se ha asociado con valores endógenos elevados de dopamina, una menor predisposición a ser fumador, un inicio en el consumo más tardío (después de los 16 años de edad), y una mayor facilidad para su abandono y para permanecer abstinentes más tiempo¹⁰². Esta asociación no se ha podido confirmar en otro estudio posterior, lo que indica que se necesita una evidencia más sólida para entender la relación entre el gen transportador de la dopamina y el tabaquismo¹⁰³.

La asociación del gen SLC6A3 con el tabaquismo se ha observado en personas con genotipos DRD2*A2, señalándose que los individuos portadores de los alelos SLC6A3*9 y DRD2*A2 tendrían un 50% menos de posibilidades de ser fumadores al presentar un número normal de receptores dopaminérgicos y un valor más elevado de dopamina. Lerman y cols.¹⁰² señalaron que los individuos portadores del polimorfismo SLC6A3*9 que presentan una elevada producción endógena de dopamina no precisarían de estímulos externos –como la nicotina– para conseguir aumentar los niveles de dopamina y, por ello, tienen menos posibilidades de ser fumadores. Los investigadores sugirieron que el incremento de dopamina sináptica en los portadores del polimorfismo SLC6A3*9 puede actuar como factor protector frente al tabaquismo, lo cual es más probable que se produzca en personas con cantidades de DRD2 normales. Sabol y cols. no encontraron asociación entre el gen SLC6A3 y el inicio al consumo, pero sí una asociación significativa entre dicho gen y la deshabituación tabáquica¹⁰⁴.

Cook y cols. relacionaron otro polimorfismo, el SLC6A3*10, con niveles inferiores de dopamina¹⁰⁵, lo que podría facilitar el consumo de tabaco en estos sujetos con el objetivo de aumentar (“normalizar”) sus niveles de dopamina. Se ha postulado que los individuos que son portadores de algunos de los alelos del gen SLC6A3 relacionados con niveles inferiores de dopamina responderían mucho mejor al tratamiento con Bupropión o Terapia Sustitutiva con Nicotina que los fumadores que poseen el alelo *9 de este gen, posiblemente debido al efecto que ejercen estos fármacos en la reposición de la dopamina a valores normales en la sinapsis¹⁰².

4.2.1.3.- Genes relacionados con el metabolismo de la dopamina

Diferentes enzimas, tales como la tirosina hidroxilasa (TH), la dopamina B-hidroxilasa, -O- metiltransferasa catecol (COMT), y la monoaminoxidasa (MAO) MAO-A y MAO-B, están implicadas en la síntesis y en el metabolismo de la dopamina.

Se han realizado estudios sobre el papel de estas enzimas en relación con la dependencia a la nicotina con resultados contradictorios¹⁰⁶. A pesar de que los genes codificadores de estas enzimas han sido investigados en estudios de trastornos, como el alcoholismo, la depresión o la esquizofrenia¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, los estudios en fumadores son limitados. La exposición al humo del tabaco parece reducir los niveles de MAO-A y MAO-B en el cerebro^{110,111}. Un estudio británico mostró una asociación mayor entre el tabaquismo y las variaciones de los genes de la MAO-A y la B-hidroxilasa de la dopamina, pero no en la COMT¹¹². Costa-Mallen y cols. demostraron una asociación modesta entre un polimorfismo del gen del enzima MAO-B y el consumo de tabaco¹¹³. La MAO-B parece que puede desempeñar un papel en el tabaquismo y que pueden tener cierta eficacia los inhibidores de esta enzima en el tratamiento coadyuvante de deshabituación tabáquica¹¹¹.

Se ha comprobado que los ratones transgénicos que sobreexpresan el gen tirosina hidroxilasa (TH) son menos sensible a la nicotina³⁶. Hasta el momento actual, el único estudio que ha investigado los polimorfismos del gen TH en fumadores no ha encontrado ninguna asociación clínica¹¹⁴. En el estudio de la dopamina betahidroxilasa (DBH) la enzima relacionada con el metabolismo de la dopamina y la noradrenalina, se ha observado una asociación con el síndrome de abstinencia¹¹².

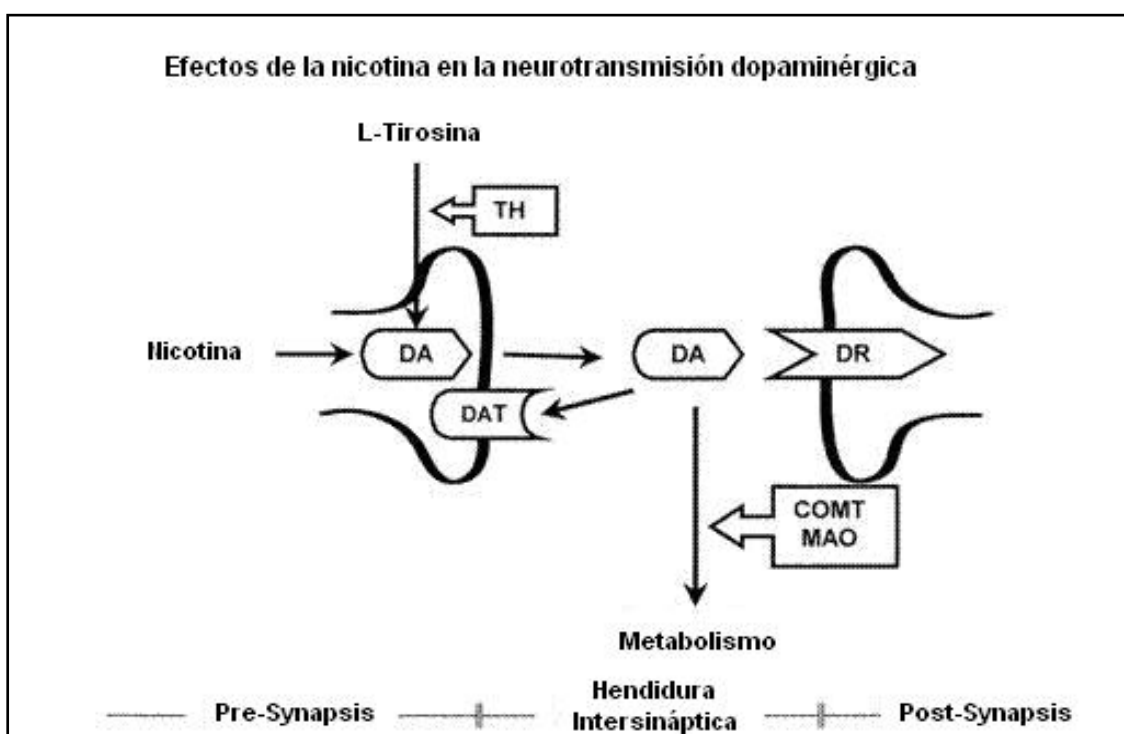


Figura 2.- Efectos de la nicotina sobre la neurotransmisión dopaminérgica. La nicotina aumenta la liberación de la dopamina (DA). TH media la conversión de tirosina a L-dopa, el precursor de la dopamina, lo que es el paso limitante en la síntesis de dopamina. El transportador de dopamina (DAT) es el sitio de la recaptación de la dopamina y regula la cantidad de dopamina sináptica. COMT y MAO están involucradas en el metabolismo de la dopamina. La dopamina se une a los receptores que median la neurotransmisión postsináptica. Los genes que codifican las enzimas y los receptores dopaminérgicos se han estudiado en el tabaquismo. DR = receptor de la dopamina⁴⁵.

4.2.2.- Sistema serotoninérgico

La administración de nicotina incrementa la liberación de serotonina en el cerebro y puede estimular el sistema serotoninérgico a nivel del hipocampo y de la corteza prefrontal. Así, los síntomas de abstinencia nicotínica pueden ser modulados por una disminución serotoninérgica en la neurotransmisión. La ausencia de nicotina disminuye la secreción de serotonina lo cual puede estar relacionado con los cambios de humor que acompañan el abandono del tabaco^{115,116}. Por ello se piensa que el sistema serotoninérgico puede estar implicado también en la dependencia nicotínica.

4.2.2.1.- Gen de la enzima triptofano hidroxilasa (TPH)

La triptofano hidroxilasa (TPH) participa en la biosíntesis de la serotonina. Aunque los polimorfismos conocidos del gen de la TPH se encuentran en regiones no codificantes y se cree que no tienen consecuencias funcionales¹¹⁷, dos polimorfismos de dicho gen, el C218A y el C779A, se han vinculado a los rasgos de la personalidad¹¹⁸, y se ha estudiado su asociación con el tabaquismo^{119,120}. Estos autores no han encontrado asociaciones entre estos polimorfismos y la dependencia de la nicotina. Sin embargo, si han encontrado asociaciones significativas en las variables de inicio al consumo (como la edad de inicio)¹²⁰ o no haber fumado nunca un cigarrillo entero¹¹⁹.

Considerando la falta de funcionalidad de los polimorfismos de la TPH y la posibilidad de falsos positivos, es probable que los marcadores TPH tengan un desequilibrio de ligamientos para un polimorfismo funcional desconocido, que la acción de la TPH sobre el hecho de fumar sea indirecta (p.ej. por un rasgo de la personalidad), o que la TPH cumpla un papel menor en la gran red de factores causales relacionados con el inicio al consumo de tabaco¹¹⁹.

4.2.2.2.- Gen de la proteína transportadora de la serotonina

La proteína transportadora de la serotonina (5-HTT), ha atraído la atención de diversos investigadores, ya que regula la magnitud y duración de la transmisión serotoninérgica. Se ha descrito un polimorfismo del gen que regula la proteína de transporte de la serotonina SLC6A4, con una variante corta (S) y una larga (L). La variante corta se relaciona con una reducción en la expresión y recaptación de serotonina, pero los resultados publicados hasta la fecha son contradictorios. Mientras Lerman y cols. no han encontrado diferencias significativas en la distribución de los alelos del polimorfismo entre fumadores y no fumadores¹²¹, Ishikawa en algunos grupos de población japonesa ha encontrado una mayor prevalencia de la variante larga (L) entre fumadores que en no fumadores o exfumadores¹²².

Estudios más recientes han informado de la asociación entre el polimorfismo del gen 5-HTT y rasgos de la personalidad de tipo ansioso,

neurótico, y que enlaza, a su vez, con una mayor predisposición de tener dependencia nicotínica^{123,124}. Para los individuos con la variante corta (S), el neuroticismo está vinculado a una mayor ingesta de nicotina, a una mayor dependencia, al hecho de fumar para estimularse y para reducir los sentimientos negativos. Por el contrario, el neuroticismo no es un impedimento para dejar de fumar en los fumadores con el genotipo L/L. Así, más que influir en el inicio del consumo, estos genotipos afectan a las motivaciones para fumar (disminución de sentimientos negativos con el tabaco), a la dependencia, y a la capacidad para dejar de fumar¹²⁴.

Gerra et al.¹²⁵ sugieren que la disminución de la expresión del gen *SLC6A4* causado por el alelo S puede estar asociada con el consumo de tabaco entre los adolescentes y con un mayor riesgo de desarrollar dependencia a la nicotina, posiblemente en relación con los rasgos de personalidad, las características temperamentales, y el bajo rendimiento escolar. Kremer et al.¹²⁶ estudiaron personas que nunca habían fumado y sujetos que habían fumado alguna vez (ex fumadores y fumadores actuales), junto con diversas medidas de la personalidad y en relación con polimorfismos del gen promotor del transportador de serotonina. En contraste con los resultados de Guerra et al.¹²⁵, Kremer et al.¹²⁶ encontraron un exceso significativo de la variante larga (L) en fumadores actuales y exfumadores, en comparación con los participantes que nunca habían fumado.

Al igual que sucede con otros sistemas neurológicos se necesitan más estudios para aclarar el papel de los polimorfismos de los genes de la serotonina. Cabe pensar que si se estableciese esta relación de forma más consistente podría explorarse la utilización de medicamentos como la Fluoxetina (inhibidor de la recaptación de serotonina) en el tratamiento del tabaquismo.

4.2.2.3.- Gen del receptor de serotonina

Aunque actualmente no existen estudios de asociación entre los polimorfismos del gen del receptor de la serotonina y el tabaquismo, diversos estudios han proporcionado datos para despertar el interés por explorar dicha relación¹⁰⁶.

Las variaciones en el gen 5-HTT, también pueden afectar a la agregación plaquetaria siendo un factor de riesgo para las patologías cardíacas, ya que un solo gen es responsable de la expresión del 5-HTT en las plaquetas y en el cerebro¹²⁷. Puede ser interesante investigar si el riesgo de padecer patología cardíaca y la adicción a la nicotina comparten susceptibilidad genética mediada por el gen 5-HTT.

4.2.3.- Sistema noradrenérgico

La vía noradrenérgica está constituida por las prolongaciones axonales existentes entre los cuerpos neuronales del Área Tegmental Ventral (ATV) y el

Locus Coeruleus (LC). La estimulación de los receptores nicotínicos produce un incremento de la liberación de noradrenalina en el LC¹²⁸. La noradrenalina liberada en el LC es capaz de estimular receptores α y β localizados en el mismo. La estimulación de los receptores α contribuye a que no aparezcan síntomas del síndrome de abstinencia tan importantes como la ansiedad, la irritabilidad y el nerviosismo. La falta pues, de liberación de noradrenalina en el LC en los adictos a la nicotina, cuando no consumen tabaco, es uno de los principales mecanismos de producción del síndrome de abstinencia y, como tal, uno de los responsables del fracaso en el intento de abandono del tabaco derivado del síndrome de abstinencia. No obstante, se ha de considerar que la noradrenalina del LC también estimula receptores β . La estimulación de estos receptores contribuye a que el fumador memorice los factores externos que se asocian al consumo de la nicotina.

La utilización de inhibidores de la recaptación neuronal de noradrenalina y de bloqueantes de los receptores β -noradrenérgicos podría ayudar a aliviar los síntomas del síndrome de abstinencia consiguiendo un mejor control de las recaídas¹²⁹.

4.2.4.- Sistema glutamérgico

Los efectos ansiolíticos desencadenados por la nicotina están mediados por su acción sobre receptores gabaérgicos y opioides del organismo^{130,131}.

Cuando un fumador, después de un corto período de abstinencia, da una calada a un cigarrillo, inhala una cantidad de nicotina que ocupa el 50% de los receptores nicotínicos presentes en sus neuronas. Esto supone que los fumadores tienen muchos de sus receptores nicotínicos cubiertos, después del consumo de los primeros cigarrillos del día. No obstante, a pesar de esto, continúan fumando. La presencia de nicotina, aún y cuando muchos receptores nicotínicos están ocupados por la misma, conduce al incremento de estos receptores en las neuronas del fumador, multiplicándose los receptores para ofrecer la diana a la nicotina libre, fenómeno conocido con el nombre de *up-regulation*.

Se ha observado que la administración crónica de nicotina incrementa la cantidad de receptores gabaérgicos en modelos animales¹³². La administración de agonistas de receptor GABA-B disminuye la autoadministración de nicotina, posiblemente debido a la reducción del efecto de recompensa originado por la nicotina, lo cual podría significar que los agonistas gabaérgicos serían útiles en el tratamiento del tabaquismo¹³³. Además, la administración crónica de nicotina en ratas da lugar a una disminución de la síntesis del receptor GABA-BR1 en el hipocampo, en un efecto que es independiente de la dosis¹³⁴; no obstante, su papel en la dependencia nicotínica aún no está establecido.

Beuten et al. llegaron a la conclusión de que los hallazgos en estudios de asociación de las variantes en el gen GABA-BR2, que codifica la subunidad 2 del receptor del tipo ácido gamma-aminobutírico B, pueden jugar un papel importante en la dependencia nicotínica¹³⁵.

Recientemente, en un estudio realizado en un grupo de 23 personas, donde se incluían cinco sujetos no fumadores ni bebedores, cinco alcohólicos no fumadores, siete fumadores no bebedores, y seis fumadores alcohólicos, Flatsher-Bader et al.¹³⁶ observaron que los niveles de expresión de los transportadores de glutamato SLC1A, SLC17A6, y el SLC17A7 fueron inducidos fuertemente por el hecho de fumar, un efecto que se redujo si existía la exposición a alcohol. Flatsher-Bader et al. concluyeron que la plasticidad del Área Tegmentaria Ventral (ATV) puede ser un importante mecanismo molecular para el mantenimiento de la adicción a la nicotina y al alcohol y que el abuso de ambas sustancias tiene efectos diferentes en la plasticidad neuronal y en la transmisión glutamatergica¹³⁶.

4.2.5.- Sistema opioide

Existen evidencias que relacionan los receptores opioides con el tabaquismo¹³⁰. La mayor parte de las drogas de abuso, incluida la nicotina, inducen sus efectos placenteros gracias a la activación de este sistema opioide endógeno. Mediante el empleo de técnicas genéticas y moleculares se han podido identificar los componentes precisos de este sistema opioide que resultan activados tras la administración de nicotina y cómo dicha activación es necesaria para que la nicotina induzca sus efectos adictivos. Los genes responsables de la codificación de estos componentes del sistema opioide endógeno presentan cierta variabilidad en humanos. Esta variabilidad genética podría explicar la diferente vulnerabilidad individual a padecer la adicción a la nicotina y explicar también la distinta respuesta que presentan fumadores frente a determinados tratamientos de cesación tabáquica.

Los receptores μ -opioide juegan un papel muy importante en la mediación de los efectos de diversas sustancias, como los opiáceos^{137,138}, cannabinoides¹³⁹ y el alcohol¹⁴⁰. Recientemente se demostró que los ratones que carecían del receptor μ -opioide no obtenían efectos de recompensa por la administración de nicotina, y el síndrome de abstinencia era menor, lo que sugiere una interacción entre la nicotina, el sistema opioide y la actividad mesolímbica dopaminérgica¹⁴¹. El polimorfismo +118 del gen *OPRM1* del receptor μ -opioide parece estar asociado a un mayor riesgo de dependencia a varias drogas, incluida la nicotina, pero no a una en concreto. La contribución de este gen a padecer una dependencia parece ser pequeña y se detecta más fácilmente en estudios que usan controles de muestras que investigan todas las formas de drogadicción¹⁴².

La naltrexona (antagonista opioide) ha sido empleada en la clínica como tratamiento coadyuvante de los programas de deshabituación tabáquica. In vitro se ha observado que altera tanto la expresión como la función de algunas subunidades del receptor nicotínico entre las que destacan la subunidad $\alpha 4$ y la subunidad $\beta 2$ ¹⁴³. Sin embargo, su eficacia terapéutica todavía no ha sido probada y no se conoce muy bien su papel en la dependencia nicotínica¹⁴⁴.

4.2.6.- Sistema cannabinoide

Recientemente se ha implicado al sistema endocannabinoide endógeno en la adicción a la nicotina. Es conocido que los receptores de membrana a los que se unen el tetrahidrocannabinol y otros cannabinoides lo son para una serie de ligandos endógenos denominados cannabinoides endógenos o endocannabinoides. Desde hace poco tiempo se conoce cómo los endocannabinoides son sintetizados, liberados, recaptados y degradados a nivel de las células nerviosas, lo que confirma su función como neuromoduladores¹⁴⁵. El consumo de cannabis frecuentemente se asocia al consumo de tabaco, además de estar implicados ambos en las zonas y mecanismos de recompensa del cerebro^{146,147}.

El sistema endocannabinoide formaría parte de la red de recompensa cerebral que activan diversos tipos de reforzadores, entre ellos la nicotina. Se ha verificado recientemente la inducción, por parte del sistema cannabinoide a través de receptores cannabinoides CB1, de mecanismos de dependencia y tolerancia, así como la facultad de producir refuerzo positivo identificándose su síndrome de abstinencia. El sistema actuaría de forma aguda y crónica sobre las neuronas del sistema dopaminérgico, modulando la transmisión de los circuitos de recompensa GABA y glutamato (receptores CB1 presinápticos regulan la liberación de glutamato y GABA) además de interactuar con neuropéptidos relevantes en la motivación (péptidos opiodes y factor de liberación corticotropo).

La nicotina y los cannabinoides afectan a determinadas funciones del sistema nervioso central aunque habitualmente lo hacen en sentido opuesto. Además, algunas áreas cerebrales con elevada densidad de receptor CB1 contienen también receptores nicotínicos de forma que se podrían producir interacciones funcionales entre ambos sistemas. Se han evaluado las consecuencias de la administración de nicotina sobre las respuestas bioquímicas y comportamentales del tratamiento con $\Delta 9$ -THC ((-)- $\Delta 9$ -6a,10a-trans-tetrahidrocannabinol) y sobre la tolerancia y la abstinencia¹⁴⁸. En lo referido a los efectos agudos, la nicotina potencia la hipotermia, antinocicepción e hipolocomoción inducida por la administración aguda de cannabinoides. Por otro lado, animales tratados con nicotina y $\Delta 9$ -THC simultáneamente presentan una atenuación de la tolerancia a $\Delta 9$ -THC y un incremento en las manifestaciones somáticas de la abstinencia. Además, el $\Delta 9$ -THC y la nicotina incrementan la expresión del proto-oncogén celular c-fos en diferentes estructuras cerebrales. En ratones *knock-out* para el receptor CB1 también se ha estudiado la respuesta a la nicotina y se ha observado que su administración crónica a ratas provoca un aumento de densidad del receptor cannabinoide CB1 en el hipotálamo, estructura relacionada con la vía de recompensa^{146,149}.

Existe, por lo tanto, un sustrato común neurobiológico para los procesos a las drogas adictivas con una interacción bidireccional a nivel cerebral, estando el sistema endocannabinoide implicado en esta vía común^{150,151}.

4.2.7.- Óxido nítrico

Existen estudios que han analizado la relación entre la nicotina y el óxido nítrico (NO) producido por el sistema nervioso central. Stevens et al.¹⁵² demostraron que la nicotina puede modular las aferencias inhibitorias del hipocampo de la rata a través del NO, donde se han demostrado la existencia de receptores colinérgicos del tipo de la bungarotoxina¹⁵³. Más recientemente¹⁵⁴ se ha llegado a concluir que la puerta de entrada auditiva al hipocampo está efectivamente mediada por la liberación de NO, a través de la activación de los receptores colinérgicos del tipo $\alpha 7$.

La nicotina ejerce parte de sus acciones en el cerebro mediante el NO, principalmente al aumentar su producción. De esta manera, además de los tratamientos existentes, la inhibición farmacológica de la óxido nítrico-sintetasa (NOS) o la administración de compuestos que liberan NO pudieran servir como posibles estrategias terapéuticas contra el tabaquismo. Se sospecha que la base de esta relación radica en la modificación del paso de los iones a través del receptor colinérgico nicotínico, lo que influiría en la regulación de la síntesis de NO al permitir la entrada masiva de calcio¹⁵⁵. En experimentos con ratas se ha observado que la síntesis del NO contribuye a la dependencia y a la tolerancia a opiáceos y también a la nicotina¹⁵⁶. El empleo de los inhibidores de la síntesis de NO en ratas ha conseguido atenuar los síntomas del SAN^{157,158}. Este efecto podría tener valor en la práctica clínica como tratamiento coadyuvante de la deshabituación tabáquica.

4.2.8.- Receptores del gusto

Mangold et al.¹⁵⁹ sugieren que los 3 SNPs en el gen TAS2R38 identificados por Kim et al.¹⁶⁰ pueden jugar un papel en el desarrollo de dependencia a la nicotina entre los afroamericanos. El haplotipo catador -PAV- se asoció inversamente con el grado de tabaquismo en un estudio de fumadores afroamericanos, mientras que el haplotipo no catador -AVI- se asoció positivamente. No se observaron asociaciones significativas en una muestra de fumadores europeos. Mangold et al.¹⁵⁹ postulan que la mayor sensibilidad oral confiere protección contra la dependencia a la nicotina. Estos resultados son muy preliminares y aún no pueden valorarse cómo influyen en la adicción a la nicotina.

4.2.9.- Sistema colinérgico

Como ya hemos señalado, la dependencia de la nicotina es un predictor importante del mantenimiento del consumo de tabaco^{161,162}. Por lo tanto, una mejor comprensión de las bases biológicas de la dependencia a la nicotina es clave para el éxito de nuevos esfuerzos destinados a ayudar a los fumadores a dejar de fumar. Los estudios realizados en gemelos han encontrado importantes evidencias de las influencias genéticas sobre la dependencia a la

nicotina¹⁶³⁻¹⁶⁵, motivando la búsqueda continua de variantes genéticas que puedan influir en la dependencia de la nicotina y por eso, además de continuar el estudio de diversos sistemas neuronales, se investiga el papel que pueden desempeñar nuevos sistemas y la interacción entre ellos.

La nicotina es un alcaloide de origen natural, presente en el tabaco, altamente adictiva¹⁶⁶, mediando una parte muy importante de sus efectos en el cuerpo humano a través de los receptores de acetilcolina o colinérgicos, de los cuales tanto la nicotina como la acetilcolina son sustancias agonistas y competitivas entre sí^{167,168}. Estos receptores se subdividen en dos tipos:

- **Receptores nicotínicos**, situados en las neuronas del sistema nervioso central, los ganglios del sistema nervioso autónomo y las glándulas suprarrenales. Se distinguen a su vez 4 subtipos: musculares, neuronales sensibles a la α -bungarotoxina, neuronales resistentes a la α -bungarotoxina y epiteliales. Estos receptores juegan un papel importante en la modulación del riesgo de múltiples tipos de adicción^{169,170}.
- **Receptores muscarínicos**, que están presentes en algunas neuronas del sistema nervioso central, en la placa neuromuscular y en órganos efectores.

El aumento del número de receptores de nicotina se cree que se debe a un proceso de desensibilización de los mismos ante una exposición prolongada a la nicotina. Los receptores que tienen más importancia en la adicción a la nicotina son los receptores neuronales resistentes a la α -bungarotoxina.

Las 12 subunidades que componen los receptores nicotínicos se dividen en las familias; la familia de nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) y la familia de tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$)^{171,172}.

Los receptores nicotínicos son proteínas integrales de membrana formados por cinco subunidades dispuestas simétricamente alrededor de un poro central¹⁷³. Cada subunidad del receptor nicotínico se compone de un gran dominio extracelular amino-terminal, cuatro dominios transmembrana, un citoplasma lazo de longitud variable entre el tercer y cuarto dominio transmembrana y un dominio corto extracelular carboxi-terminal¹⁷⁴.

El dominio extracelular de subunidades α contiene cisteínas adyacentes que son importantes para la unión del ligando, mientras que las subunidades β carecen de estos residuos¹⁷⁵. A diferencia de otras subunidades α , la subunidad $\alpha 5$ no contribuye a la unión del ligando ya que le falta un residuo clave de tirosina¹⁷⁶. La combinación de diferentes subunidades de los nAChRs (receptores nicotínicos de acetilcolina) puede conducir a la formación de una amplia gama de subtipos de nAChRs.

Las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ pueden formar receptores heteroméricos con las subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$, mientras que las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$ pueden formar receptores homoméricos que están bloqueados por una bungarotoxina¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Por otro lado, la subunidad $\alpha 9$ puede formar un receptor heteromérico con $\alpha 10$ ^{180,181} y $\alpha 7$ puede formar un receptor heteromérico con $\beta 2$ ¹⁸². Cada uno de estos subtipos de receptores tiene propiedades electrofisiológicas y propiedades farmacológicas diferentes^{175,183,184}.

Los receptores nicotínicos ensamblados a partir de las subunidades, se dividen en dos clases, neuronales y musculares. En los humanos las subunidades neuronales consisten en subunidades $\alpha 2$ enlazados con subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ y $\beta 2$ enlazada con $\beta 4$, y las subunidades musculares son $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ y γ . La subunidad $\alpha 8$ se ha detectado en el tejido de aves, pero no en los receptores nicotínicos musculares de mamíferos. El receptor nicotínico muscular se compone de dos subunidades alfa, una beta, una delta y una gamma o bien una subunidad épsilon¹⁸⁵. Los nAChRs heteropentaméricos predominantes en el cerebro son $\alpha 4\beta 2$ y en el sistema nervioso periférico son los formados por las subunidades $\alpha 3\beta 4$ ^{186,187}. En algunos casos, $\alpha 5$ también contribuyen a estos dos subtipos principales de receptores heteropentaméricos. La subunidad $\alpha 7$ es la única subunidad conocida que forma nAChRs en el cerebro de los mamíferos¹⁸⁸. El circuito de recompensa de dopamina, que juega un papel fundamental en la adicción, es modulada por varios subtipos de nAChR, incluyendo $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 2\alpha 5$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ y $\alpha 7$ ¹⁸⁹⁻¹⁹³.

Los genes que codifican la subunidad $\alpha 6$ y la subunidad $\beta 3$ se encuentran situados de forma contigua en configuración cola a cola en el cromosoma 8. Sus productos proteicos están co-localizados en los receptores nicotínicos de la sustancia negra, el área tegmental ventral, el cuerpo estriado, y el locus coeruleus¹⁸⁶. Se ha observado que tanto los receptores que contienen la subunidad $\alpha 6$, como los que contienen la subunidad $\beta 3$ tienen un papel importante en la neurotransmisión dopaminérgica, contribuyendo así a la recompensa y al refuerzo de la conducta¹⁹⁴. Los receptores que contienen $\alpha 6\beta 2\beta 3$, así como los receptores que contienen $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ en el cuerpo estriado median la liberación de dopamina. En contraste, los receptores $\alpha 6\beta 2$ situados en el colículo superior parecen estar involucrados en la liberación de GABA^{193,195}. La subunidad $\beta 3$ se cree que es importante para el ensamblaje y la estabilidad de los nAChRs que contengan la subunidad $\alpha 6$ ¹⁹⁴.

La diversidad funcional de la familia de los nAChRs ofrece abundantes perspectivas para el diseño de nuevas terapias. Actualmente, los nAChRs están siendo activamente investigados como fármacos objetivos para los trastornos del sistema nervioso, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la ansiedad, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, la depresión, la epilepsia, el dolor, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, el síndrome de Tourette y la adicción a la nicotina¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

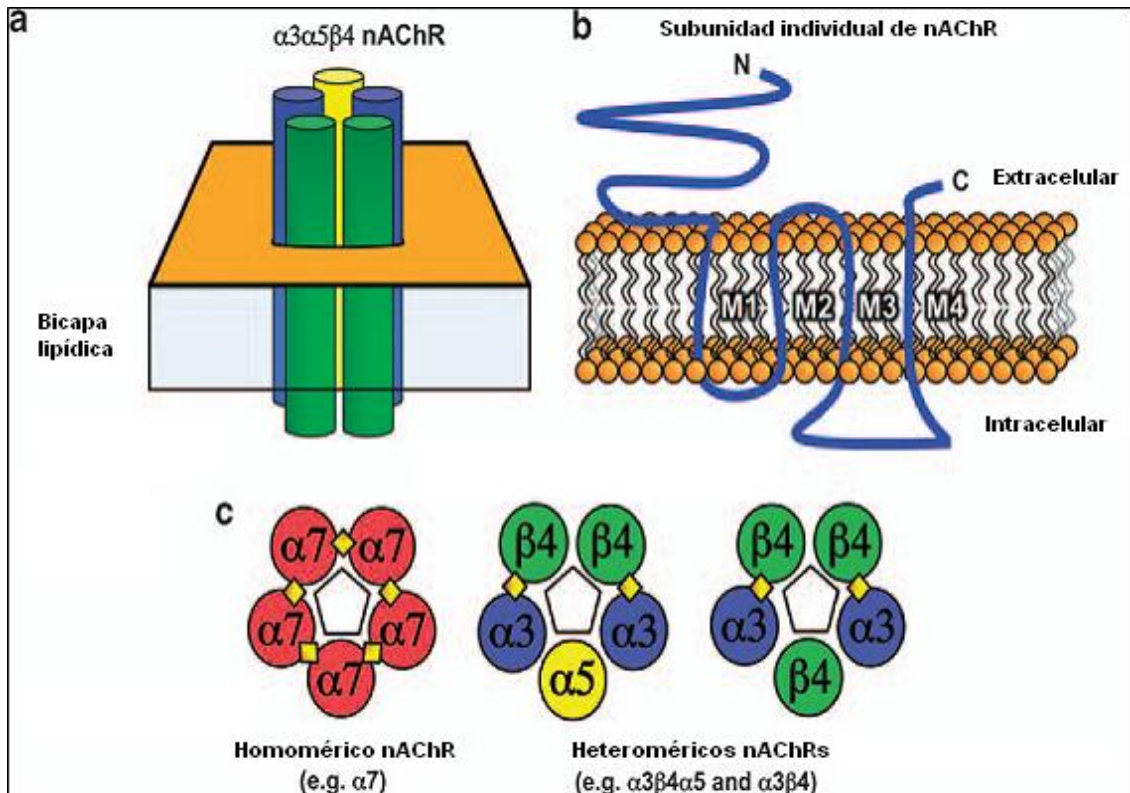


Figura 3.- Estructura del nAChR. (A) Representación esquemática que ilustra la disposición pentamérica de subunidades de un nAChR ensamblado. (B) Conservación de los dominios de una subunidad del nAChR incluido los segmentos amino (N) y carboxilo (C) terminales, segmentos transmembrana (M1-M4) y el bucle intracelular. (C) Ensamblado de los subtipos de los nAChRs heteroméricos y homoméricos. Las subunidades de los nAChRs son representadas individualmente como círculos de colores, con los diamantes que representan los sitios de unión al ligando. Los pentágonos blancos en el centro de cada pentámero representan la región del poro²⁰¹.

Debido a la escasez de ligandos selectivos para los subtipos de receptores nicotínicos, la composición exacta de las subunidades de los receptores que regulan los efectos gratificantes del tabaco y el desarrollo de la dependencia de la nicotina no se conocen con exactitud. Aunque la llegada de estudios con ratones modificados genéticamente ha proporcionado un enfoque experimental útil para evaluar la contribución de las diferentes subunidades in vivo¹⁹⁹. Por lo tanto, la identificación de los receptores nicotínicos cerebrales y sus polimorfismos en los que actúa la nicotina para provocar su refuerzo positivo, y también aquellos receptores responsables de desarrollar dependencia y síndrome de abstinencia, pueden proporcionar información valiosa sobre la neurobiología de la nicotina en los fumadores y facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la adicción al tabaco²⁰⁰.

En general, el papel de la genética para determinar el consumo de tabaco parece ser un trabajo importante y complejo. Gran parte de la dificultad en la identificación de los genes clave, es el hecho de que es probable que sean numerosos, cada uno con efectos pequeños, que en conjunto forman varios fenotipos asociados con el tabaquismo. A pesar de sus pequeños efectos, los

polimorfismos genéticos son de gran importancia para la Salud Pública ya que el riesgo atribuible a ellos es probable que sea importante por su frecuencia en la población²⁰². Desafortunadamente, los estudios de genes individuales a menudo no tienen la fuerza necesaria para encontrar tales pequeños efectos. Además, hay limitaciones de estudios anteriores que hacen que los intentos de unificar los resultados sean difíciles, cuestiones que en el futuro son necesarias a tener en consideración. La variable de exposición utilizada en los estudios, es decir, un gen en particular, puede ser insuficiente por sí sólo para determinar la asociación. Es decir, es necesario examinar las interacciones gen-gen y genética-medio ambiente. En estudios futuros, el valor que ofrece el estudio de un solo lugar, puede ser superado en parte mediante el estudio de haplotipos o la asociación de múltiples polimorfismos. Las subunidades de los receptores nicotínicos y las interacciones entre genes y entre genes-ambiente que mayor interés han suscitado se enumeran a continuación:

- **Subunidad $\beta 1$**

La subunidad $\beta 1$ ha sido estudiada por Lou et al. quienes ha demostrado la asociación existente entre la presencia del polimorfismo del receptor *CHRN1* en la región rs2302763 y la dependencia nicotínica en una muestra de población europea-americana, encontrando mayor proporción de esta variante en fumadores con respecto a los no fumadores²⁰³.

- **Subunidad $\beta 2$**

La subunidad $\beta 2$ también ha sido relacionada con el consumo de tabaco. L. Greenbaum y cols.²⁰⁴ han asociado la región rs2072660 del receptor *CHRN2* y el consumo diario de tabaco en mujeres israelíes.

- **Subunidad $\alpha 2$**

La subunidad $\alpha 2$ se ha postulado como necesaria para el refuerzo de las propiedades adictivas de la nicotina. Se han descrito varios polimorfismos en el gen de la subunidad $\alpha 2$ del receptor nicotínico, pero sin que se hayan encontrado datos sólidos que apoyen la relación entre dichos polimorfismos y el inicio o el mantenimiento del consumo de tabaco²⁰⁵.

- **Subunidad $\beta 3$**

En estudios de Bierut²⁰⁶ y Saccone²⁰⁷ que utilizaron como criterio de inclusión a fumadores con un número de cigarrillos consumidos a lo largo de su vida mayor o igual a cien, se han encontrado asociaciones altamente significativas entre la subunidad $\beta 3$ y la dependencia a la nicotina, con evidencia para desarrollar el doble de riesgo de ser dependientes una vez expuestos al consumo de cigarrillos, en forma de herencia recesiva. Esta asociación ha sido reforzada por Hoft et al.²⁰⁸ demostrando la existencia de tres SNPs, rs7004381, rs4950 y rs2304297 del gen *CHRN3* y su asociación con la adicción nicotínica. Sin embargo, otros estudios que utilizan criterios de inclusión menos estrictos no han encontrado resultados que demuestren niveles de asociación importantes entre esta subunidad y la dependencia nicotínica²⁰⁴.

- **Subunidad $\alpha 4$**

La subunidad $\alpha 4$ del receptor nicotínico está altamente expresada en el sistema nervioso central (SNC) y juega un papel importante en la tolerancia, la recompensa, y en la modulación de la función dopaminérgica en el sistema mesolímbico, puntos críticos para el desarrollo de la dependencia nicotínica¹⁶⁸. Debido a esto, el gen CHRNA4 es un objetivo prioritario de investigación sobre los factores genéticos que influyen en la dependencia del tabaco.

Los estudios iniciales que implicaban al receptor CHRNA4 en la adicción a la nicotina fueron realizados con animales^{168,209,210}. Posteriormente, diversos estudios en población humana, han mostrado asociaciones significativas entre las medidas del consumo de cigarrillos o de la dependencia a la nicotina y el receptor CHRNA4. La adicción a la nicotina se ha asociado a dos SNPs del receptor CHRNA4, rs1044396 y rs1044397, en un estudio basado en fumadores varones chinos²¹¹. Otro trabajo sobre seis SNPs del receptor CHRNA4 en población europeo-americana (EA) y afro-americana (AA) ha encontrado hallazgos importantes y significativos para fenotipos específicos relacionados con la dependencia nicotínica, destacando la región rs2236196 en las mujeres AAs²¹². Saccone et al.²¹³ han proporcionado cierto apoyo a la relación entre la región rs2236196 y la dependencia nicotínica, aunque en su estudio observan una asociación aún más fuerte entre la región rs2273504 y el consumo de tabaco.

Kent et al.²¹⁴ adoptaron un enfoque que abarcaba varios niveles de análisis, incluida la bioinformática, en modelos de cultivos celulares y modelos humanos de laboratorio, observando que la expresión de dos polimorfismos de un solo nucleótido del receptor CHRNA4 en el tejido cerebral post mortem humano (rs6122429 y rs2236196) se asociaban con las respuestas subjetivas de la conducta fumadora. Los análisis revelaron que la región rs2236196, sobre todo en el genotipo TG, se relacionaba con efectos fisiológicos derivados del consumo de tabaco (palpitaciones, mareos,...) y el aumento de la concentración de nicotina en forma de pico, con efectos placenteros subjetivos desde el primer cigarrillo, cada vez más intensos según el número de cigarrillos consumidos. Mientras que los individuos con el genotipo GG en la rs6122429 afirmaron tener mayor recompensa después de haber fumado tres cigarrillos, pero no después del primero o el segundo, es decir, necesitaban la concentración de nicotina pico proporcionada por lo menos por tres cigarrillos para obtener placer.

Diversos estudios inmunológicos indican que esta subunidad junto con la subunidad $\alpha 2$, son las que tienen mayor afinidad por la nicotina en el cerebro¹⁷², siendo su formación regulada tras exposición crónica a la nicotina^{168,215}. Son importantes subunidades reguladoras de los procesos de refuerzo de la nicotina.

- **Subunidad $\alpha 5$**

La subunidad $\alpha 5$ participa en la composición de múltiples receptores nicotínicos^{216,217} que contribuyen a la estimulación de la liberación de DOPA en el núcleo estriado, una región implicada en vías de recompensa y que es crucial para el desarrollo de la dependencia nicotínica^{193,218}. Los individuos con

variaciones específicas en el gen del *CHRNA5* parecen tener el doble de posibilidades de ser dependientes de la nicotina²⁰⁶, jugando dicho gen un papel importante en los efectos psicoactivos de la nicotina a corto y largo plazo²¹⁹.

Las pruebas biológicas más convincentes de un factor de riesgo para la dependencia de la nicotina se encuentran en el SNP, rs16969968 región no sinónima, del gen *CHRNA5*. Los individuos que son homocigóticos para el alelo A, el alelo de riesgo, poseen el doble de riesgo de desarrollar dependencia a la nicotina. A pesar de que la subunidad $\alpha 5$ no se ha estudiado ampliamente y no hay informes de efectos funcionales conocidos de este polimorfismo, llama la atención que un polimorfismo de carga no sinónima altere el bucle intracelular de la subunidad $\alpha 4$ de los receptores nicotínicos, la cual sí se ha demostrado que altera la función de los receptores nAChRs en los ratones en respuesta a la exposición de nicotina^{209,220,221}. Esta asociación entre la región rs16969968 de *CHRNA5* y la dependencia nicotínica ha sido replicada en varios conjuntos de datos independientes^{222,223}, también para rasgos relacionados con los fumadores, incluyendo cantidad de cigarrillos fumados e intensidad del consumo de cigarrillos (grado grave >20cig/día frente a grado leve <10cig/día)^{207,224} y se ha descrito como la asociación más significativa de todo el genoma en varios meta-análisis recientes²²⁵⁻²²⁷.

El alelo menor de la secuencia rs169668 del gen *CHRNA5*, parece ser un factor de riesgo para el tabaco y un factor protector para la dependencia a la cocaína²²⁸, un hallazgo que sugiere que el refuerzo de la nicotina y el de la cocaína pueden estar disociados a nivel del receptor *CHRNA5*. Es sorprendente que la asociación con la dependencia a la cocaína sea en dirección opuesta a la dependencia nicotínica. Los autores especulan que los resultados pueden explicarse por la función reducida de la variante D398N del *CHRNA5* recogida en estudios *in vitro*²²⁹ y que explican la dirección opuesta de la asociación considerando el papel dual de los receptores colinérgicos en vías excitatorias dopaminérgicas e inhibitorias gammaaminobutíricas.

Saccone et al.²⁰⁷ identificaron una nueva variación del gen *CHRNA5*, en la región 514743 como uno de los marcadores más importantes asociados con la dependencia nicotínica. De nuevo, en el año 2010, Saccone y cols.²³⁰ vuelven a demostrar en un meta-análisis que la asociación entre rs16969968 y la conducta de fumar es consistente. Estos investigadores exponen una asociación significativa y robusta del gen *CHRNA5* no sólo con la región rs16969968, sino también con rs1051730 y rs55853698, con fumadores con un alto grado de tabaquismo a través de conjuntos de datos muy diversos, ya que los datos que aportan para el análisis de las muestras del rango de fumadores y dependencia de la nicotina provienen de pacientes con múltiples enfermedades como la esquizofrenia, el cáncer de mama, la diabetes tipo 2, cardiopatías, el consumo alcohol o la dependencia de otras sustancias²³⁰.

- **Subunidad $\alpha 6$**

Un gran interés se ha centrado en el papel potencial de la subunidad $\alpha 6$ en la regulación de los procesos de refuerzo de la nicotina²³¹. Esta subunidad es conocida como un subtipo de unidad que modula las vías de recompensa de la dopamina en ratones¹⁸⁹. Greenbaum et al.²⁰⁴ han descubierto una asociación

entre el receptor CHRNA6 (intrón 2) y la dependencia a la nicotina en una muestra de mujeres estudiantes israelíes.

- **Subunidad $\alpha 7$**

Existen datos contradictorios sobre el papel de la subunidad $\alpha 7$ en la regulación del refuerzo positivo de la nicotina. Para Markou y colaboradores²³² la subunidad $\alpha 7$ modula el efecto positivo de la nicotina, sin embargo, para Grottick et al.²³³ dicha subunidad no juega ningún papel en la regulación del refuerzo de la nicotina.

- **CHRNA3-CHRNA6**

Recientes estudios de asociación genética han proporcionado pruebas de que los genes CHRNA3 y CHRNA6 están asociados con la dependencia de la nicotina y con las respuestas subjetivas a la misma²³⁴. Bierut et al.²⁰⁶ y Saccone et al.²⁰⁷ encontraron una asociación significativa entre el receptor CHRNA3 y el exón 6 (UTR 3') del CHRNA6 con el hecho de fumar.

En un estudio reciente²⁰⁸ se ha demostrado la asociación entre el bucle CHRNA6B3 y la dependencia nicotínica, definida esta última por los síntomas recogidos en el DSM-IV. Esto sugiere que la asociación de la dependencia del tabaco con estos genes está presente con criterios de diagnóstico para la dependencia estrictos y validados, lo cual fortalece la evidencia de que variaciones en estos genes contribuyen a la dependencia nicotínica.

Para Saccone et al.²³⁵, en los genes CHRNA3 y CHRNA6, la evidencia sugiere que puede haber al menos 2 locus distintos asociados con la dependencia nicotínica. El SNP más fuertemente asociado con el tabaquismo se encontraba en la región rs13277254.

- **CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4**

Berrettini et al.²²³ han correlacionado haplotipos de los genes CHRNA3 y CHRNA5 con el tabaco. Estos genes parcialmente se superponen cola a cola en su configuración y comparten los extremos 3' en direcciones opuestas en el cromosoma 15q25 junto con el gen CHRNA4^{236,237}. Esta solapación de sus extremos finales es objeto de múltiples estudios en desarrollo. El estudio de Berrettini et al.²²³ analiza la asociación entre las variaciones genéticas de los receptores CHRNA3 y CHRNA5 y el número de cigarrillos diarios consumidos y señala la susceptibilidad a la dependencia nicotínica cuando existen variaciones genéticas. Estos genes de los receptores CHRNA3 y CHRNA5 han emergido como fuertes candidatos para el análisis de la dependencia nicotínica en numerosos trabajos^{206,207}.

El grupo liderado por Robert Weiss, en el año 2008, localizó una región del cromosoma 15, rs 1696968, donde están codificadas tres de las subunidades que forman el receptor nicotínico colinérgico: $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$. En el cromosoma 15, los 3 genes forman un bucle, para el cual se buscaron haplotipos mediante secuenciación y búsqueda de polimorfismos (SNPs). Los resultados demostraron que existen haplotipos de susceptibilidad y haplotipos protectores en el locus CHRNA3A5B4 asociados con la severidad de la dependencia nicotínica cuando los fumadores empezaron a fumar antes de los

16 años de edad, y no se apreció esta asociación en fumadores que habían empezado a fumar después de los 16 años de edad, por lo que se considera que la adolescencia es un período clave en la susceptibilidad a la nicotina, siendo un factor de riesgo muy importante en esta franja de edad el tener un determinado haplotipo para la región génica *CHRNA3A5B4*²³⁸.

Hay 2 asociaciones genéticas distintas independientes en el bucle genético *CHRNA3A5B4* en el cromosoma 15; por un lado en la región rs1696968, y por otro lado una variación en la región rs578776 que se ha implicado en el comportamiento de los fumadores^{239,240}.

Una segunda región en el grupo *CHRNA3A5B4*, rs578776, parece también estar implicada en el consumo de tabaco. El análisis conjunto de los SNPs rs1696968 y rs578776 indica que estas dos variantes pueden ejercer independientemente su influencia sobre la vulnerabilidad a la dependencia nicotínica. El coeficiente de correlación es muy bajo entre ellos, lo que significa que la asociación de la enfermedad en uno no explica estadísticamente la asociación con la enfermedad con el otro.

Como hemos comentado anteriormente, en el cromosoma 15q25.1, la región que contiene las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$, ha sido asociada con la dependencia nicotínica en múltiples estudios demostrando una asociación muy fuerte²⁴¹. Las evidencias indican que hay múltiples locus en esta región que tienen baja correlación entre ellos y pueden tener un efecto biológico distinto. En la población europea estos distintos locus son representados por la región rs1696968 (región no sinónima de *CHRNA5*), rs578776 y rs588765²¹³. Recientemente en un estudio de población afro-americana (AAs), Saccone et al. han vuelto a demostrar la asociación entre rs1696968 y la dependencia nicotínica²³⁵. Ninguno de estos nuevos genes estudiados muestra una asociación tan consistente en la población como la de la rs1696968 del bucle *CHRNA3A5B4* y la dependencia nicotínica. Esto sugiere que las nuevas regiones necesitan más investigación.

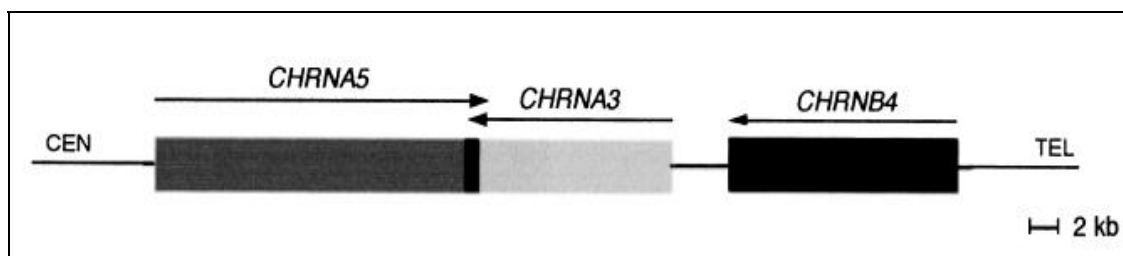


Figura 4.- Representación esquemática de la estructura genómica del bucle formado por los genes *CHRNA3/A5/B4* que muestra el solapamiento cola a cola entre el gen *CHRNA5* y *CHRNA3*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. CEN; centrómero, TEL; telómero²³⁶.

- **CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 / CHRNA3-CHRNA6 / CHRND-CHRNA4 / CHRNA4-CHRNA1**

Saccone et al.²¹³, en el año 2009, han realizado el estudio más completo hasta el momento sobre los genes de las subunidades del receptor nicotínico y su asociación con la dependencia nicotínica: han estudiado la relación entre la dependencia a la nicotina y 226 SNPs de 16 genes nicotínicos en una muestra del NICSNP (Collaborative Study of the Genetics of Nicotine Dependence Consortium) de 1050 fumadores y 879 controles de descendencia europea. Se han obtenido varios resultados significativos de asociación con la dependencia nicotínica: dos en el grupo de genes CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4, uno en el grupo CHRNA3-CHRNA6, y uno en CHRND-CHRNA4. Dos genes adicionales CHRNA4 y CHRNA1 presentan SNPs con resultados potencialmente significativos para la adicción nicotínica. En este estudio, se sigue apoyando el importante papel para el desarrollo de dependencia nicotínica de la región no-sinónima rs16969968 del CHRNA5, ya informado previamente²⁰⁷. Debido a que el desequilibrio de ligamentos incluye no sólo el grupo CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 sino también los genes vecinos LOC123688, PSMA4 e IREB2, sería necesario realizar un trabajo adicional para identificar definitivamente una variante de causalidad entre todos los SNPs que se correlacionaran con rs16969968.

En otro trabajo de Saccone et al.²³⁵, 2010, se han investigado si las variantes en otros genes de las subunidades del receptor nicotínico colinérgico (CHRNA) afectan el riesgo de dependencia a la nicotina en una muestra de fumadores afro-americanos (AAs) y americanos europeos (AEs), lo que permite apreciar diferentes efectos en las dos poblaciones. Mientras que las variantes dentro o cerca de los receptores CHRND-CHRNA4, CHRNA7 y CHRNA10 sólo mostraron asociación moderada con el riesgo de dependencia a la nicotina en la muestra de AAs, los receptores CHRNA4, CHRNA3-CHRNA6 y CHRNA1 mostraron asociación en las dos poblaciones (AAs y EAs). CHRNA4 y CHRNA7 muestran polimorfismos de nucleótido único que tienen efectos opuestos entre las poblaciones. Previamente, la región rs2231532, en CHRNA10 había sido también asociada al consumo de tabaco en población EAs por Ehringer²⁴² y la región rs 2236196 del receptor CHRNA4 se había asociado en muestras independientes de fumadores descendientes europeos^{243,244} y en mujeres²¹². También había sido vinculado persistentemente con la dependencia de la nicotina el grupo CHRND-CHRNA4 encontrando asociación en el extremo del cromosoma 2q con la dependencia nicotínica²⁴⁵ y con otros fenotipos de adicción²⁴⁶⁻²⁴⁸.

Múltiples genes de las subunidades del receptor nicotínico fuera del cromosoma 15q25 probablemente sean importantes en el desarrollo de dependencia a la nicotina, y algunos de estos riesgos sean compartidos a través de las diversas poblaciones. Es importante estudiar la dependencia genética a la nicotina en diversas poblaciones. Diferencias en la frecuencia de alelos y en la arquitectura genética entre poblaciones pueden ayudar a estrechar la asociación con las variantes biológicamente causales. También son importantes las diferencias fenotípicas entre las poblaciones. La prevalencia de fumadores actuales es similar en EAs y AAs (Centers for Disease and Prevention 2008). Existe evidencia de que los AAs tienen un

riesgo más alto de dependencia con niveles bajos de cigarrillos por día comparados con los EAs²⁴⁹.

Thorgeirsson et al. han demostrado una asociación en fumadores de un polimorfismo de nucleótido único (SNP rs1051730) en el cromosoma 15q24 con la cantidad de tabaco consumido y con la dependencia a la nicotina evaluada mediante el test de Fagerström^{222,250}. El polimorfismo es igualmente frecuente en fumadores y no fumadores, lo que puede interpretarse como que dicho polimorfismo no predispone para el inicio del consumo, pero si guarda relación con la dependencia entre los fumadores.

4.2.9.1.- Patologías relacionadas con los receptores nicotínicos

En los últimos años, una serie de análisis de ligamiento, estudios de asociación de genes y de asociación de genoma completo han señalado un posible papel de las subunidades de los receptores colinérgicos $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$, tanto en el número de cigarrillos consumidos diariamente^{222,223}, como en la dependencia nicotínica^{207,222}, en la génesis del cáncer de pulmón^{222,251} y de la enfermedad arterial periférica²²².

➤ **Cáncer de pulmón**

El estudio de los receptores *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* ha cobrado un interés creciente debido a los recientes informes que muestran una asociación significativa entre éstos y el cáncer de pulmón^{222,251,252}, una enfermedad en la que el tabaquismo es uno de los factores de riesgo más importante. Las asociaciones con el cáncer de pulmón ya se correlacionaron con la región no sinónima rs16969968 del *CHRNA5*²⁵¹, con la región rs1051730²²², y con la región rs8034191²⁵². En algunos trabajos se ha estudiado el riesgo de padecer un tipo de determinado de cáncer, así, se ha demostrado que la región no sinónima, rs16969968 de *CHRNA5* aumenta el riesgo de Adenocarcinoma pulmonar en una población italiana²⁵³.

Las variaciones genéticas de las subunidades *CHRNA3A5B4* pueden contribuir a incrementar el riesgo de dependencia nicotínica y de padecer cáncer pulmón independientemente y a dos niveles²¹⁹:

- Por incremento del número de cigarrillos fumados en base a la mayor dependencia nicotínica.
- Por insertarse ellas directamente dentro de la cascada formadora del cáncer de pulmón.

Los informes difieren en su interpretación de esta asociación con el cáncer de pulmón: es decir, si se trata de un efecto directo sobre la vulnerabilidad para padecer cáncer de pulmón, o si puede ser explicada totalmente por el efecto indirecto del aumento del riesgo por consumir cigarrillos. Thorgeirsson ha demostrado que el SNP en la región rs1051730 se asociaba tanto con dependencia a la nicotina como con el cáncer de pulmón, sin existir mayor riesgo de cáncer de pulmón en los no fumadores, lo que sugiere que la asociación con el cáncer de pulmón era un efecto de la

dependencia nicotínica²²². Marchand²⁵⁴ a través de biomarcadores urinarios ha demostrado que dos variantes vinculadas con el riesgo de cáncer de pulmón en CHRNA3 (rs1051730) y CHRNA5 (rs16969968), se asociaban con la intensidad del hábito de fumar y la exposición a un carcinógeno nitrosamina específico del tabaco, comprobando que los portadores de estas variantes extraen una mayor cantidad de nicotina y están expuestos a una dosis más alta por cada cigarrillo de 4-(methylnitrosamino)-1-(3-piridilo)-1-butanona que los no portadores de dichas variantes genéticas. Para Amos et al.²⁵² la región rs1051730 del bucle CHRNA3A5B4 se encuentra fuertemente asociada con el cáncer de pulmón y débilmente asociada con la dependencia a la nicotina. Además, dicha región rs1051730 parece estar asociada con el cáncer de pulmón familiar²⁵⁵.

Se ha estudiado la relación entre el cáncer de pulmón y la dependencia nicotínica en distintos grupos de población, no sólo en población europea. Recientemente, algunos trabajos muestran variaciones en el cromosoma 15q25 que también afectan al riesgo de cáncer de pulmón y al riesgo de ser dependientes de la nicotina en la población afro-americana^{213,256,257} y en la población asiática^{258,259}.

Existen datos contradictorios sobre la fuerza y efecto de los distintos polimorfismos en la génesis del cáncer. Así, para para Saccone et al.²¹³ en el estudio de la dependencia de la nicotina y cáncer, las regiones rs16969968 y rs578776 del bucle CHRNA3A5B4, tienen datos comparables y tamaño del efecto similar para la asociación. Por el contrario, para Hung²⁵¹ es mayor la asociación entre el cáncer y la región rs16969968 frente a la región rs578776. Trabajos futuros podrán aclarar esto.

Como se ha mencionado anteriormente, las razones de que en algunos trabajos existan datos contradictorios pueden incluir diferencias en las poblaciones, tamaño de las muestras, los fenotipos utilizados para evaluar la dependencia nicotínica y los instrumentos utilizados para medir los fenotipos²⁴¹. Por ejemplo, la mayoría de los estudios se realizaron en poblaciones de orígenes europeas, en los que la frecuencia del alelo para la rs16969968 es del 37%, mientras que en las poblaciones africanas la frecuencia de este alelo es significativamente menor^{229,260}.

Debido a que los alelos de riesgo para la dependencia nicotínica coinciden con los alelos de riesgo para el cáncer de pulmón, éstos se convierten en blanco de quimioterapia.

➤ **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica**

Existe una considerable variación en la susceptibilidad de los fumadores para desarrollar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); no todos los fumadores sufren EPOC ni desarrollan el mismo grado de obstrucción de la vía aérea. Pese a que varios estudios de agregación familiar han sugerido un fuerte componente genético en su génesis^{261,262}, el único factor de riesgo genético que ha sido estudiado en profundidad es la deficiencia de alfa-1 antitripsina (A1AT), que está presente en el 1-2% de las personas con EPOC²⁶³. Esto sugiere que existen otros factores genéticos que predisponen a la obstrucción de la vía aérea y que todavía no han sido estudiados.

Recientemente, un estudio de asociación del genoma completo ha demostrado una asociación estadísticamente significativa entre un grupo de genes colinérgicos *CHRNA3A5* del cromosoma 15q.25, y el grado de tabaquismo expresado en forma de índice paquetes-año, el enfisema radiológico evaluado por tomografía computarizada de alta resolución, y la obstrucción al flujo aéreo²⁶⁴.

Sreekumar y cols. muestran una asociación significativa entre dos SNPs de los receptores nicotínicos *CHRNA3A5*, en las regiones rs 8034191, y rs 1051730, y el grado de obstrucción de la vía aérea en fumadores, evaluado por el flujo espirado en el primer segundo (FEV1), observando un riesgo poblacional para el desarrollo de EPOC del 12.2% en sujetos portadores del alelo C de SNP rs 8034191²⁶⁵. También se aprecia una interacción genotipo-medio ambiente entre el riesgo de desarrollar EPOC y el SNP rs 8034191 en fumadores activos, lo que indica que existe un mayor riesgo de desarrollar EPOC en aquellos fumadores activos portadores de este alelo que en los exfumadores. Esa interacción gen-medio ambiente podría estar relacionada con la adicción a la nicotina, ya que los fumadores que tienen mayor dificultad para dejar de fumar pueden ser más propensos a desarrollar EPOC. Alternativamente podría existir un grupo de individuos con mayor riesgo de EPOC si continúan fumando²⁶⁵. Varios estudios apoyan la idea de Sreekumar y señalan a los genes localizados en este cromosoma como responsable de gran parte de la susceptibilidad en fumadores para desarrollar EPOC²⁶⁶⁻²⁶⁸.

➤ **Cáncer de pulmón y EPOC**

El estudio de Young²⁶⁹ y colaboradores sugiere que variaciones genéticas de la interacción *CHRNA3A5* se asocian con la presencia de EPOC y que la asociación entre estos polimorfismos y el cáncer de pulmón puede ser confundida por la coexistencia de la EPOC. Con respecto a esto último, muchos estudios han sugerido que los factores genéticos que subyacen a la EPOC, que se caracteriza por la destrucción del parénquima pulmonar y la fibrosis pequeñas vías respiratorias, puede ser compartida con la susceptibilidad del cáncer de pulmón^{202,270}. Esto puede ser factible si las variaciones genéticas confieren una respuesta aberrante de los efectos inflamatorios inducidos por el tabaco para el desarrollo de la EPOC y el inicio de cáncer. Sin embargo, como la reducción del FEV1 también se ha asociado de forma independiente con el cáncer de pulmón²⁷¹ y con la mortalidad por cáncer de pulmón²⁷², es posible que la presencia de EPOC también pueda explicar estas asociaciones^{222,251,252}. Es importante destacar la existencia de estudios previos que sugieren que los SNPs de estos receptores (*CHRNA3A5*) podrían ser la base para el desarrollo de EPOC^{266,267}.

Según Young²⁶⁹, el efecto de los nAChRs es mayor para el desarrollo de EPOC que para el cáncer de pulmón, por lo tanto, la EPOC es más probable que actúe como un factor de confusión entre las asociaciones de las variaciones genéticas y el cáncer de pulmón^{266,267} y de la enfermedad arterial periférica²⁷³.

La relación entre los genes *CHRNA3A5* y la dependencia nicotínica ha sido estudiada en varios trabajos^{207,223}. Por lo tanto, es razonable concluir que

las variantes relacionadas con la dependencia nicotínica simultáneamente pueden tener un efecto significativo en las enfermedades relacionadas con el tabaquismo como la EPOC, el cáncer de pulmón y la enfermedad arterial periférica^{222,251,252}. Para Thorgeirsson et al.²²² la mayoría del efecto de las variantes en los genes CHRNA3A5 se relaciona con la adicción a la nicotina, con sólo un pequeño efecto sobre el riesgo de cáncer de pulmón y un efecto aún más pequeño en la enfermedad arterial periférica (EAP).

➤ **Cardiopatía**

Dado que la nicotina es un potente agente angiogénico²⁷⁴, los receptores nicotínicos pueden representar un objetivo terapéutico para la modulación de trastornos caracterizados por la angiogénesis fisiológica^{275,276} (como en la cicatrización de una herida) o patológica (como en la neovascularización de la retina o en la angiogénesis tumoral). Se ha comprobado que los efectos inhibitorios de la α -Bungarotoxina, un antagonista de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ ²⁷⁴, receptores predominantes en la angiogénesis, bloquea los procesos angiogénicos. Por lo tanto, CHRNA7 se presenta como una nueva diana en la angiogénesis fisiológica y patológica, cómo la angiogénesis tumoral, la inflamación y la angiogénesis impulsada por la hipoxia. La hipoxia y la isquemia sensibilizan a los receptores CHRNA7 en las células endoteliales^{277,278}, pudiendo jugar un papel en la angiogénesis durante la hipertrofia cardiaca. En el estudio de Ni y cols.²⁷⁹ se encontró mayor expresión del receptor CHRNA7 en el ventrículo izquierdo (VI) a las 16 semanas tras la Coartación Aórtica, pudiendo jugar la subunidad $\alpha 7$ un papel importante en la angiogénesis durante la hipertrofia cardiaca.

➤ **Patología Psiquiátrica**

Existe una fuerte evidencia epidemiológica de que la dependencia nicotínica es mucho mayor en individuos que sufren enfermedades psiquiátricas, como trastornos de ansiedad, depresión o esquizofrenia, en comparación con la tasa de dependencia de la población general²⁸⁰. Por lo tanto, la mayor susceptibilidad de la adicción a la nicotina en los pacientes con comorbilidad psiquiátrica puede reflejar enfermedades asociadas a deficiencias o variantes de los receptores nicotínicos¹⁹⁹.

Muchos fármacos utilizados para tratar trastornos de ansiedad, como la Fluoxetina o la Buspirona ejercen efectos directos sobre los receptores nicotínicos^{281,282}, lo que sugiere un papel modulador de los receptores nicotínicos en la acción terapéutica de estos compuestos. Diversos estudios señalan a las subunidades $\beta 3$, $\alpha 7$ y $\alpha 4$ como moduladores de los estados de ansiedad^{283,284}.

Los fumadores son más propensos que los no fumadores a presentar síntomas depresivos y a ser diagnosticados de depresión mayor²⁸⁵. Muchos agentes antidepresivos que se utilizan para tratar la depresión mayor pueden antagonizar a los nAChRs^{281,286}. Las subunidades $\beta 2$ y $\alpha 7$ pueden desempeñar una función clave en la regulación de los estados afectivos y los efectos de los fármacos antidepresivos²⁸⁷.

Al igual que sucede con los trastornos de ansiedad y depresión, el consumo de tabaco es considerablemente mayor en pacientes con esquizofrenia en comparación con la población general²⁸⁸. La evidencia acumulada sugiere que puede existir una relación entre los SNP de los receptores colinérgicos en el cromosoma 15q13-14, que contienen la subunidad $\alpha 7$ y los síntomas de la esquizofrenia^{289,290}.

4.2.9.2.-Receptores nicotínicos y alcohol

Los polimorfismos del bucle *CHRNA3A5B4* pueden desempeñar también un importante papel en el hábito enólico, predisponiendo a una mayor vulnerabilidad al consumo de alcohol^{291,292}. La infusión de mecamilamina (antagonista de los receptores nicotínicos) en voluntarios sanos disminuye el deseo de consumir alcohol²⁹³ y bloquea los efectos eufóricos desencadenados por la ingesta de alcohol²⁹⁴. Se ha visto que la administración sistémica o directa de mecamilamina en el Núcleo Accumbens disminuye el consumo de etanol en ratas²⁹⁵.

4.2.9.3.-Receptores nicotínicos y edad de consumo

Con respecto a la edad, diferencias en cuanto al inicio del consumo de tabaco pueden ayudar a explicar las diferentes trayectorias de individuos con alta o baja dependencia nicotínica²⁰⁶. Los descubrimientos actuales sugieren que fumar tempranamente implica dependencia nicotínica no sólo a través de los receptores *CHRNA5*, sino también a través de *CHRN2*²⁹⁶. L. Greenbaum y cols. han relacionado también al receptor *CHRN2* directamente con el inicio del consumo, mientras que los receptores *CHRN3*, *CHRNA5*, *CHRNA7* y *CHRNA9* los relaciona con la adicción a la nicotina. Recientemente²³⁴ se ha demostrado que la región rs4950 del receptor *CHRN3* se asocia con las primeras respuestas subjetivas al tabaco en adolescentes. Este hecho plantea la posibilidad de que las intervenciones tempranas en los adolescentes portadores de esta variación pueden evitar que se conviertan en futuros fumadores. Schlaepfer I. y cols.²⁹¹ estudiaron la asociación entre las variaciones genéticas del bucle *CHRNA5A3B4* y la iniciación al tabaco, demostrando una posible relación entre dichas variaciones y la edad temprana de experimentación con el tabaco.

4.2.9.4.-Receptores nicotínicos y embarazo

El tabaquismo materno durante el embarazo se asocia con bajo peso al nacer y diversas complicaciones durante el mismo^{297,298}. Las mujeres tienen más probabilidades de dejar de fumar durante el embarazo que en cualquier otro momento de sus vidas, pero algunas mujeres embarazadas continúan fumando. Un estudio actual de asociación de todo el genoma²⁹⁹ ha demostrado una asociación entre un SNP localizado en la región rs1051730 del bucle *CHRNA3A5B4* con el grado de tabaquismo y la dependencia de la nicotina. El objetivo de este trabajo fue probar si el mismo polimorfismo que predispone a

un mayor consumo de cigarrillos también reduciría la probabilidad de dejar de fumar durante el embarazo. Anteriormente, este polimorfismo se había asociado con el grado de tabaquismo y dependencia nicotínica (evaluada por el test de Fagerström²⁵⁰) en los fumadores²²². Se observó una fuerte asociación entre el alelo de riesgo de la región rs1051730 y las probabilidades de seguir fumando durante el embarazo. También se comprobó una tendencia al bajo peso del recién nacido en los hijos de madres fumadoras portadoras del alelo de riesgo rs1051730. Estos datos apoyan el papel de los factores genéticos que influyen en el abandono del tabaco durante el embarazo.

En resumen, los estudios epidemiológicos sugieren la posible existencia de factores genéticos que pueden explicar la conducta frente al tabaco, siendo múltiples los genes que pueden estar implicados. Los que presentan mayor probabilidad para estar implicados son los genes de los receptores de dopamina, los genes transportadores (dopamina y serotonina) y, en general, cualquiera de los genes relacionados con el metabolismo de la nicotina. En los últimos años los genes relacionados con los receptores colinérgicos, y más concretamente con los nicotínicos, están cobrando mayor protagonismo. Se ha investigado la relación de cualquier alteración en los alelos de estos genes con respecto a la mayor o menor dependencia nicotínica, o con cambios en la personalidad del sujeto, o incluso con enfermedades mentales.

La mayoría de los datos genéticos se han obtenido a partir de diseños de investigación que tienen limitaciones en el estudio de comportamientos complejos. Además, las inconsistencias en el cuerpo de la evidencia actual ha limitado la utilidad clínica de los hallazgos. Cada vez se reconoce más que los fumadores no son un grupo homogéneo y, además, las influencias genéticas en diferentes etapas de la carrera de fumador, tales como la iniciación, mantenimiento y el cese pueden no ser idénticas. Es necesario investigar las diferencias de comportamiento que conducen a la dependencia del tabaco a través de estudios y definir los subgrupos de fumadores con fenotipos caracterizados de manera clara, de forma que eviten los problemas derivados de la estratificación de las muestras de poblaciones.

Dado que varios genes pueden mediar la dependencia a la nicotina, utilizando las técnicas de investigación genética más modernas, que permiten la detección rápida de las variaciones de múltiples genes, los estudios pueden ser más eficientes y rentables. Considerando la evidencia existente entre las diferencias étnicas en el metabolismo de la nicotina, parece oportuno que estas investigaciones genéticas incluyan los diferentes grupos étnicos. Más importante aún, junto con la determinación de las interacciones de los genes entre sí, la investigación genética tendrá que examinar las relaciones de los genes con otros factores biológicos y ambientales. Este enfoque integrado puede ayudar a desarrollar mejores estrategias para reducir el tabaquismo.

Se necesita investigación adicional para identificar de manera más definitiva toda la variación funcional genética que influye en la conducta frente al tabaco. Sin embargo, está bastante claro que existen alelos de riesgo en determinados genes que favorecen la adicción a la nicotina. Esta información puede ser usada para iniciar proyectos de investigación de impacto en la salud pública potencialmente importantes, como por ejemplo:

- Desarrollar nuevos medicamentos para la adicción a la nicotina que “normalicen” la función del receptor nicotínico, teniendo en cuenta las diferencias existentes que sean atribuibles a los “alelos de riesgo” de adicción a la nicotina, en comparación con los “alelos de protección”. Presumiblemente, estos tratamientos serían más eficaces y también más necesarios en personas con los “alelos de riesgo”.

- Crear programas de prevención dirigidos a los adolescentes que posean los “alelos de riesgo” de adicción a la nicotina, con el genotipado previo de las poblaciones objeto de estudio y evaluaciones prospectivas durante años. Esta oportunidad puede ser especialmente relevante dado que estos alelos pueden predisponer a los individuos a la aparición temprana de la dependencia nicotínica, aunque la determinación poblacional de los alelos de riesgo, y en especial en poblaciones de adolescentes, presenta numerosos problemas éticos.

Es probable que al menos en cuanto a los análisis genéticos se refiere, el tabaquismo deba ser visto como una colección de formas de comportamiento más que un comportamiento único. Las diferencias en la heredabilidad sugieren la existencia de subclases de la conducta fumadora que pueden tener implicaciones para la selección de tratamientos eficaces. Por ejemplo, el conocimiento de los aspectos de la conducta de fumar en el que la influencia genética sea muy importante, nos puede ayudar a identificar a los niños con mayor riesgo de convertirse en fumadores, en virtud de la conducta frente al tabaco de sus padres, pudiendo ser destinatarios de mensajes de prevención.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- Hipótesis

Durante los últimos años existe una mayor comprensión de los factores genéticos involucrados en la adicción a la nicotina. Diversos autores señalan que existe cierto determinismo genético que, en algunas personas, favorece una mayor vulnerabilidad al tabaco, siendo objeto de investigación diversos genes que podrían contribuir a esta vulnerabilidad. Un lugar de convergencia de las acciones de la nicotina, que podría desempeñar un papel importante en la dependencia de la nicotina, es la familia de los receptores neuronales colinérgicos y, dentro de ellos, de forma más específica los receptores nicotínicos de la acetilcolina localizados en diversos lugares del cerebro.

Nuestro estudio plantea la hipótesis de la existencia de una asociación de las variaciones genéticas que contiene los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 y varios fenotipos de fumadores, lo que podría condicionar la existencia de diferencias entre fumadores y no fumadores y también una mayor o menor dificultad para el abandono del tabaco en aquellos fumadores que desean realizar un intento serio de abandono.

2.- Objetivos

El principal objetivo de nuestro estudio ha sido analizar la relación entre las variaciones genéticas los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 y el inicio al consumo de tabaco. Para ello se ha realizado un estudio comparativo entre sujetos que nunca habían fumado, considerados como grupo control, y sujetos fumadores activos en el momento de su participación en el estudio.

Un objetivo secundario ha sido estudiar la posible influencia de factores como el género y la edad entre la población fumadora que acude a una consulta especializada de tabaquismo, y su relación con las variaciones genéticas estudiadas.

PACIENTES Y MÉTODOS

1.- Pacientes

Los sujetos incluidos en el estudio fueron clasificados según el criterio de controles sanos o fumadores, entendiéndose como controles sanos a sujetos voluntarios que nunca han fumado y como fumadores a todo sujeto que cumple los criterios de la definición de la OMS, es decir, sujetos que han fumado cualquier cantidad de cigarrillos, diariamente, en el último mes.

A todos ellos se les informó debidamente de la naturaleza y finalidad del estudio, obteniendo su autorización para la extracción de una muestra de sangre para su estudio genético.

Los no fumadores fueron seleccionados en varias consultas de atención primaria de los Centros de Salud San Juan y La Alamedilla del Área de Salud de Salamanca. La determinación del criterio de no fumador fue explicado detenidamente a cada uno de los voluntarios para asegurar que ninguno de ellos hubiera fumado nunca. Únicamente se incluyeron aquellos casos en los que existía certeza absoluta de no haber fumado nunca, ni tan sólo un cigarrillo. En este grupo se incluyeron 467 personas de los cuales 157 fueron hombres y 310 mujeres.

Los fumadores se seleccionaron a partir de fumadores en terapia de deshabituación tabáquica en la Unidad Especializada de Tabaquismo del Hospital Universitario de Salamanca siguiendo el protocolo de actuación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)³⁰⁰. A todos se les informó debidamente de la naturaleza y objetivos del estudio, y se les solicitó la autorización para la extracción de sangre para su estudio genético. En este grupo se incluyeron 507 personas de los cuales 271 fueron hombres y 236 mujeres.

Las muestras de sangre se obtuvieron previo consentimiento, tanto de controles como de fumadores, siguiendo las regulaciones legales del Comité de Ética del Complejo Hospitalario de Salamanca y de Estudios Clínicos de España.

2.- Variables

Las variables incluidas en el estudio y recogidas en todos los individuos, tanto fumadores como controles, han sido:

- Edad (años)
- Género (hombre/mujer)

- Categoría (fumador/no fumador)
- Polimorfismos del gen *CHRNA3* (AA, GG y AG)
- Polimorfismos del gen *CHRNA5* (AA, GG y AG)
- Polimorfismos del gen *CHRNA4* (CC, TT y CT)

Las variables estudiadas exclusivamente en los fumadores han sido:

- Abstinencia al año (éxito o fracaso en la deshabituación tabáquica)
- Nivel de dependencia (determinada mediante el test de Fagerström)
- Monóxido de carbono en aire espirado
- Niveles de cotinina en sangre

3.- Métodos

3.1.- Control y seguimiento de los sujetos incluidos en el estudio

Como ya se ha señalado los sujetos incluidos en el estudio fueron clasificados según el criterio de controles sanos o fumadores. En los no fumadores, después de comprobar mediante autodeclaración informada que no eran fumadores, se recogieron los datos referidos a la edad y el género y únicamente se les realizó la extracción de sangre para el estudio genético.

Los fumadores incluidos en el estudio habían acudido a la Unidad Especializada de Tabaquismo (UET) del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Salamanca para iniciar el proceso de cesación tabáquica y por tanto se encontraban en fase de acción. El diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes se realizó según las recomendaciones de la SEPAR, siguiendo el protocolo habitual de la UET y registrando todo el proceso en una historia clínica informatizada. Fueron incluidos en el estudio todos aquellos que autorizaron su inclusión y firmaron el consentimiento informado autorizando la realización de la extracción de sangre para el estudio genético.

En el grupo de fumadores en la primera visita (previa al inicio de la abstinencia), se registró el número de cigarrillos/día y el número de paquetes año, se empleó el test de Fagerström para valorar el grado de dependencia nicotínica, y se determinaron los niveles de cotinina en sangre. El control de la abstinencia y también el grado de dependencia se valoró en las visitas sucesivas mediante la determinación de monóxido de carbono (CO) en el aire espirado según protocolo estandarizado y utilizando un cooxímetro Bedfont.

A todos los pacientes en fase de acción se les ofreció seguimiento clínico, comenzando la primera visita a los 7 ó 15 días de iniciar la abstinencia y las siguientes al mes, dos, tres, seis meses y al año, aumentando opcionalmente la frecuencia de las visitas en función de la evolución clínica del paciente. En cada una de estas visitas se registraron los siguientes parámetros:

- Autodeclaración verbal de abstinencia

- Valoración de la eficacia del tratamiento propuesto
- Valoración del síndrome de abstinencia y posibles efectos secundarios
- Apoyo psicológico
- Determinación del peso, tensión arterial y monóxido de carbono (CO) en el aire espirado

A efectos de valoración del resultado del proceso clínico de cesación tabáquica se entendió como fumador abstinentes a todo aquel que reunía la condición de declarar que no fumaba y tenía una concentración de CO en aire espirado inferior a 10 ppm en el momento de realización de la consulta. El criterio final de abstinencia utilizado en el estudio es el de aquellos fumadores que habiendo alcanzado la abstinencia durante el proceso de deshabitación se mantenían sin fumar al año de iniciado el estudio y cumplían por tanto el criterio de abstinencia continuada desde hacía varios meses.

3.2.- Extracción del DNA de sangre periférica

3.2.1.- Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.

Se obtuvieron células mononucleadas de sangre periférica de los controles y de los fumadores, recogida en tubos con anticoagulante EDTA, mediante gradientes de densidad por centrifugación durante 20 minutos a 400g a 4°C dando lugar a tres fases: fase superior plasmática, la interfase de aspecto blanquecino con células nucleadas, y la fase inferior eritrocitaria.

A la capa intermedia que contenía las células nucleadas, se le añadió agua bidestilada estéril para provocar la lisis osmótica de los eritrocitos arrastrados en el paso previo. Tras nueva centrifugación durante 20 minutos a 400g a 4°C se resuspendió el botón celular de células nucleadas en tapón Fornace (0,25 M sacarosa, 50 Mm TrisHCL Ph 7,5 25 Mm MgCl, 5 Mm MgCl₂). A esta mezcla se le añadió EDTA (10 Mm de concentración final), proteinasa K (Boehringer Mannheim FRG) y SDS (dodecil sulfato sódico al 1% de concentración final) en una concentración estimada de 5×10^6 células/ml, incubándose la mezcla a 55°C durante 8-16 horas.

3.2.2.- Purificación del DNA.

La purificación del DNA se realizó con fenol-CIAA (cloroformo / alcohol isoamílico 24:1 v/v) centrifugándolo durante 10 minutos a 580g a temperatura ambiente, recogiendo la fase sobrenadante acuosa que contiene el DNA en solución.

Tras añadir un volumen igual de fenol-CIAA a la fase acuosa se la sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente, tras la precipitación del DNA mediante 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20° C), se lavó con etanol al 70% y, tras centrifugación breve a 1600g, se dejó evaporar el etanol y se disolvió el DNA en agua bidestilada estéril.

3.2.3.- Cuantificación del DNA

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA obtenido se calculó tras medir la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (GeneQuante, Pharmacia).

El cociente DO260/DO280 se empleó para determinar el grado de contaminación proteica: 260 nm fue la longitud de onda a la que absorbe el DNA y 280 nm a la que se absorben las proteínas. Se consideraron aceptables valores comprendidos entre 1,6 y 2, siendo el óptimo 1,8.

Las muestras de DNA se conservaron a -20° C en tubos Eppendorf.

3.3.- Amplificación de DNA mediante PCR cuantitativa

Se realizó una dilución que contenía 5 µL de Master Mix TaqMan®, 4,25 µL ddH₂O, 0,25 µL de los oligonucleótidos (forward y reverse) que sirvieron como cebadores de la reacción y 0,5 µL de DNA de cada individuo a estudio.

Siempre se usó un control negativo (sin DNA) para asegurarnos que no existía contaminación de las muestras estudiadas y que las reacciones eran específicas para cada muestra.

La realización de la PCR en tiempo real se efectuó empleando TaqMan® Genotyping (MasterMix Applied Biosystems), en un termociclador StepOn (Applied Biosystems), realizándose cada reacción por triplicado 40 ciclos: 0,15 min a 95°C; 1,00 min a 60°C.

4.- Estudio de los polimorfismos de los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4.

Por este procedimiento se obtuvieron para el gen CHRNA3 los siguientes genotipos:

AA: Homocigoto
 GG: Homocigoto
 AG: Heterocigoto

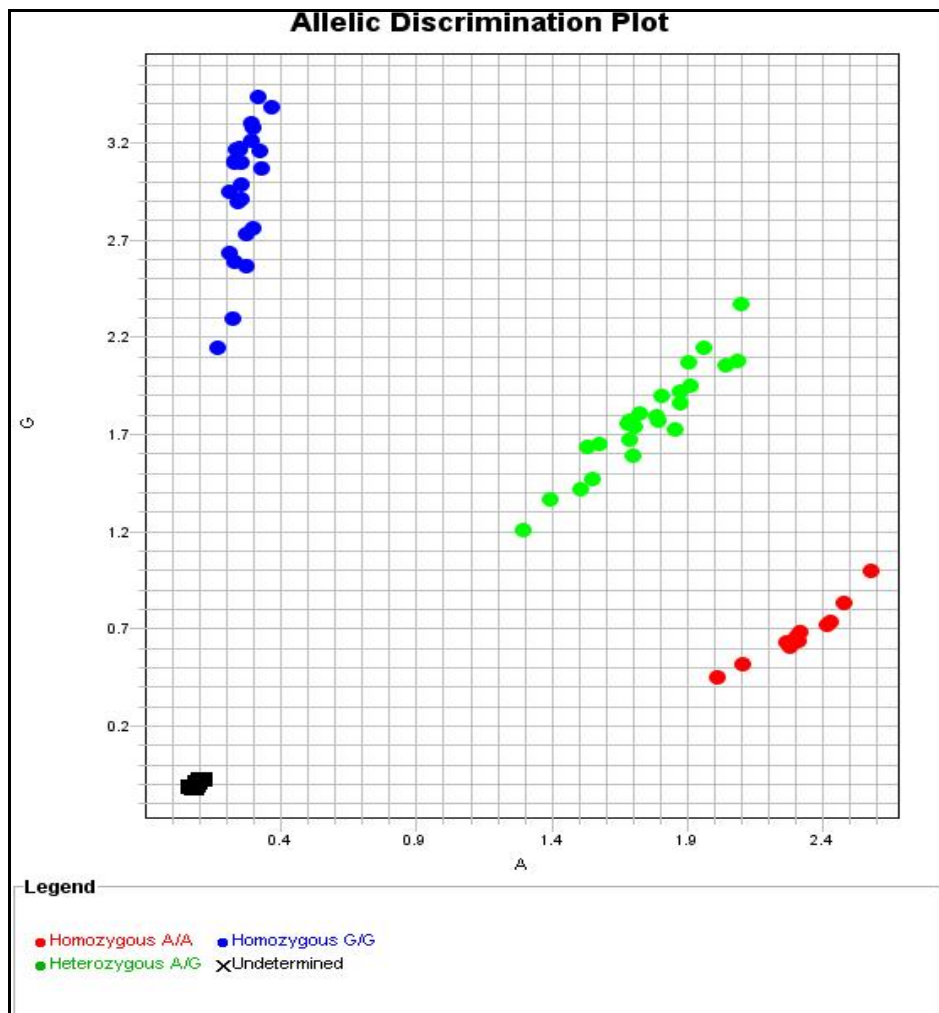


Figura 5.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen CHRNA3 en controles.

Para el gen *CHRNA5* se alcanzaron los siguientes genotipos:

- AA: Homocigoto
- GG: Homocigoto
- AG: Heterocigoto

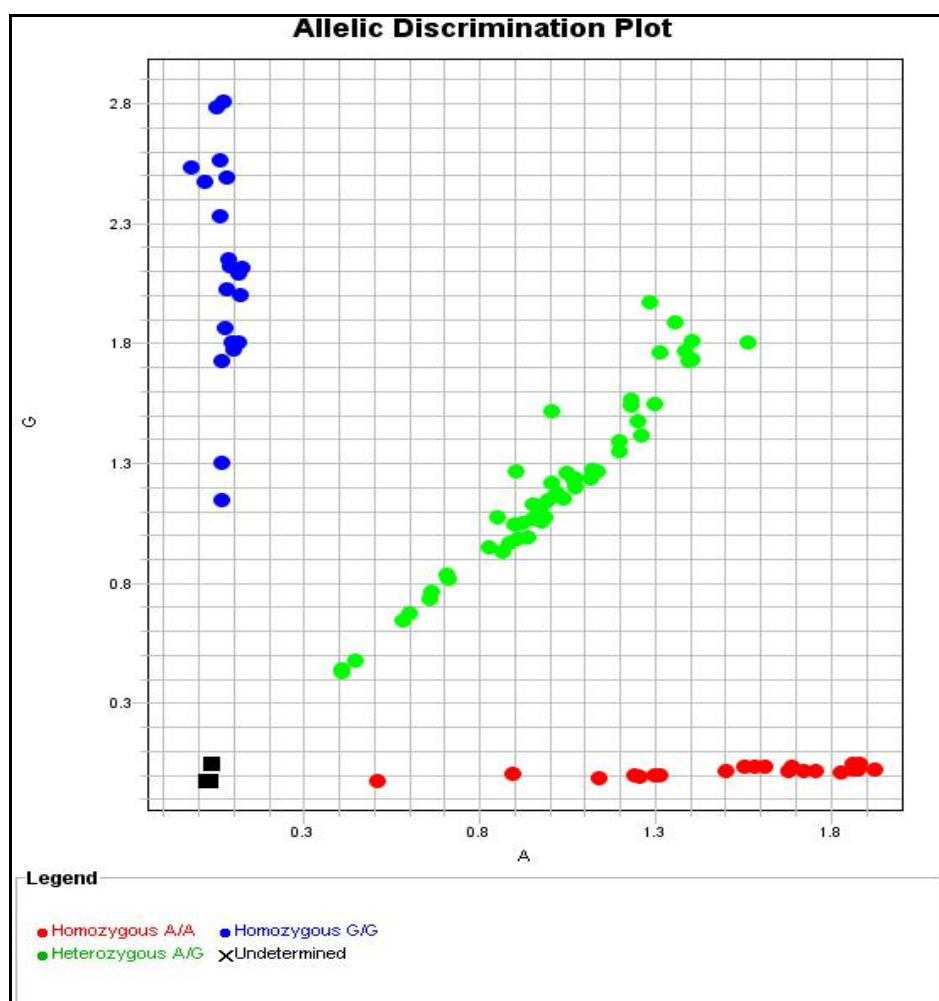


Figura 6.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen *CHRNA5* en controles.

Para el gen CHRNA4 se consiguieron los genotipos:

- TT: Homocigoto
- CC: Homocigoto
- TC: Heterocigoto

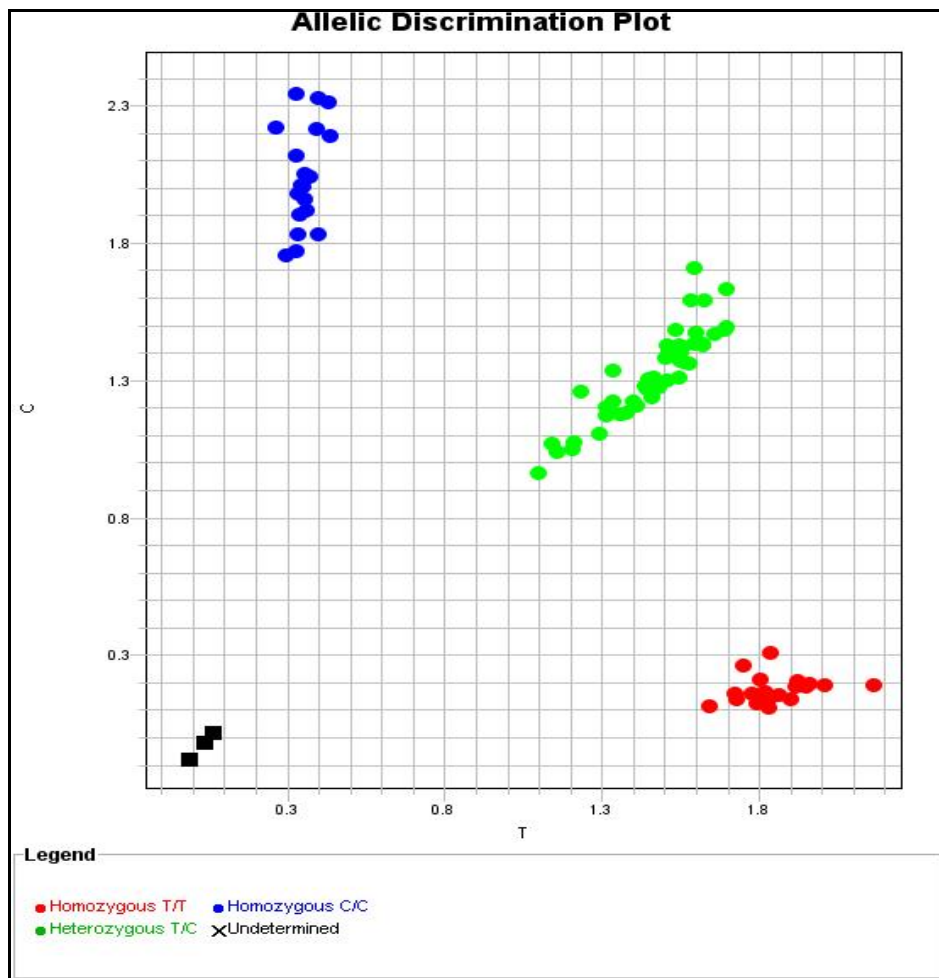


Figura 7.- Imagen obtenida tras realizar PCR cuantitativa de los polimorfismos del gen CHRNA4 en controles.

5.- Estudio Estadístico.

Se realizó el estudio descriptivo de cada polimorfismo: rs12914385 (test C__12106059__10) de *CHRNA3*, rs17487223 (test C__32510316__10) del gen *CHRNA4* y rs16969968 (test C__26000428__20) del gen *CHRNA5*. Para cada uno de los tres genes objeto de investigación se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas.

Mediante análisis estratificado se relacionaron los factores sociodemográficos edad (categorizada en \leq de 40 años, 41-60 y \geq 60 años) y género (hombre o mujer) con la condición de fumador (caso) o de no fumador (control).

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en las poblaciones muestreadas se comprobó mediante test exactos basados en cadenas de Markov, efectuados con el paquete estadístico GENEPOP 3.4 (Raymont & Rousset, 1995).

La existencia de desequilibrios de ligamiento se comprobó mediante el test exacto de Fisher con el paquete estadístico GENEPOP 3.4 y cadenas de Markov. También con este programa y cadenas de Markov, se determinó la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas (test exacto de Fisher) y genotípicas (test exacto basado en log-likelihood) entre las submuestras de controles y fumadores. Para construir las cadenas de Markov se utilizaron 10.000 dememorizaciones, 1.000 lotes (*batches*) y 10.000 iteraciones por lote. En todas las comparaciones se utilizó la corrección de Bonferroni.

Mediante análisis multivariable (regresión logística múltiple) se valoró la asociación entre la condición de fumador o no fumador asociada al alelo y a los genotipos, considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para este análisis los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS. (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

RESULTADOS

1.- Características de los sujetos incluidos en el estudio

La prevalencia actual del tabaquismo en España es del 29,5% de la población mayor de 16 años, mostrando una tendencia marcada a disminuir en varones y a la estabilización en mujeres, lo que corresponde a la fase tres de la epidemia según el esquema de López y cols³⁰¹. En esta fase de la epidemia un amplio número de fumadores se plantea dejar de fumar, pero a medida que disminuye el número de fumadores, los que continúan fumando son más “resistentes” y precisan de apoyo para conseguir abandonar el tabaco. Este tipo de fumadores son los que suelen demandar apoyo en las consultas o unidades especializadas de tabaquismo.

Los 507 fumadores incluidos en el estudio procedían de la Unidad Especializada de Tabaquismo del Hospital Universitario de Salamanca, a la que habían acudido para realizar un intento serio de abandono del tabaquismo y a los que se propuso un tratamiento multicomponente. Los 467 controles fueron reclutados en distintas consultas especializadas del Hospital Universitario de Salamanca y de Atención Primaria del Área de Salud de Salamanca.

En la tabla 1 se recogen las características relacionadas con la edad y el género de los sujetos incluidos en el estudio. Se observa que la edad media de los individuos no fumadores, considerado como grupo control, es superior (en 3 años) a la de los fumadores. Sucede lo mismo respecto de la distribución según intervalos de edad: en el grupo de no fumadores la proporción de mayores de 61 años es superior (casi 4 veces más) que en el grupo de fumadores. Sin embargo, el grupo de edad comprendida entre 41 y 60 años, son casi más de la mitad de los individuos fumadores (51,1%), frente al 30,6% del grupo de los no fumadores; precisamente este es el segmento de edad en el que los fumadores se plantean más abandonar el tabaco y, por ello, el grupo que solicita habitualmente más apoyo para dejar de fumar, lo que justifica el sesgo existente entre fumadores y controles y el agrupamiento de los fumadores dentro de este segmento de edad. El elevado número de exfumadores de edad media-elevada y la morbimortalidad atribuida al consumo de tabaco en edades avanzadas hacen que en el grupo de edad mayor de 60 años el número de fumadores sea menor.

VARIABLE	Grupo control, no fumadores (n = 467)	Fumadores (n = 507)	P
Edad, media(DE), años	47,76 (18,40)	44, 64 (10,55)	0,147
Grupo edad, nº (%): ≤ 40	197 (42,2%)	212 (41,8%)	0,000
41-60	143 (30,6%)	259 (51,1%)	
>61	127 (27,2%)	36 (7,1%)	
Género, nº (%): Varones	157 (33,6%)	271 (53,5%)	
Mujeres	310 (66,4%)	236 (46,5%)	0,000

Tabla 1.- Características de los controles y de los casos.

La distribución por género también presenta algunas diferencias entre controles y fumadores (predominio de varones entre los fumadores: 53,5% frente a 46,5%, y de mujeres entre los controles: 66,4% frente a 33,6%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. También en este caso, la mayor prevalencia de fumadores varones entre la población general conlleva que el número de hombres que acuden a estas consultas sea superior a las mujeres. En la figura 8 están representados los grupos de edad y género para los fumadores y no fumadores.

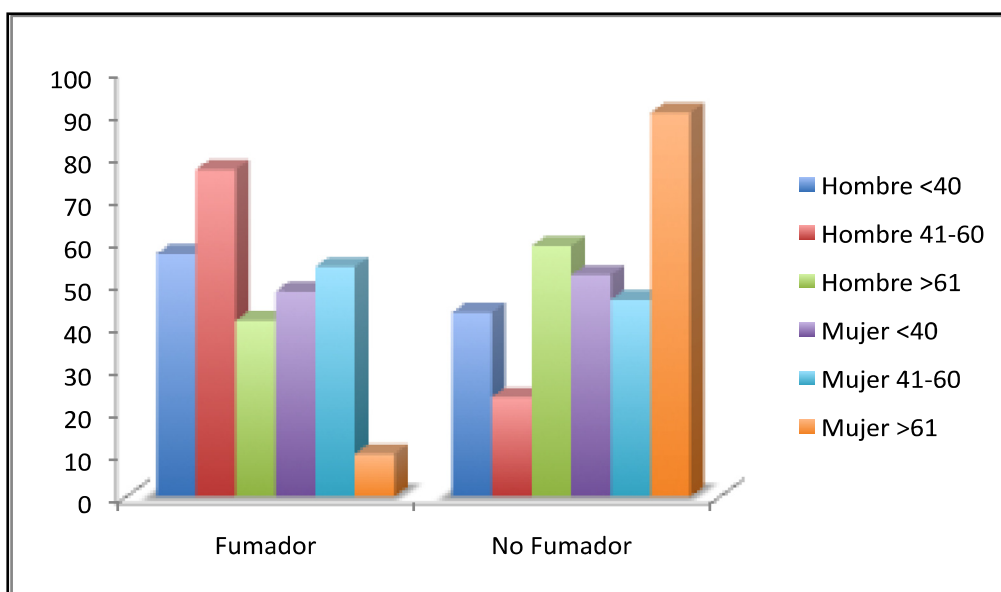


Figura 8.- Porcentajes de fumadores y no fumadores en función de la edad y el género.

Al observar la existencia de diferencias entre ambos grupos, para comprobar la validez de la población objeto de estudio a efectos del análisis de resultados y de las conclusiones que pudieran derivarse de los mismos, fue necesario conocer previamente si estas poblaciones eran representativas de la población general, tanto de la población no fumadora como de la fumadora. Para ello se realizó un estudio de equilibrio de Hardy-Weinberg que nos permitió comprobar la representatividad de ambos grupos respecto de la población general no fumadora y fumadora.

Una vez comprobada la representatividad de la muestra objeto de estudio respecto de la población general y con el fin de estudiar si se cumplía la hipótesis de nuestro estudio, es decir la existencia de una asociación de las variaciones genéticas que contienen los genes *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA4* y varios fenotipos de fumadores, analizamos la posible relación existente entre las variaciones genéticas de los genes *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA4* y el consumo de tabaco, realizando un estudio comparativo entre los sujetos de nuestro estudio que nunca habían fumado (grupo control) y los sujetos fumadores que habían acudido a la Unidad Funcional de Tabaquismo del Hospital Universitario de Salamanca. Los resultados observados para cada gen se exponen a continuación de forma individualizada.

2.- Análisis del gen CHRNA3

2.1.- Estudio comparativo del gen CHRNA3 entre fumadores y no fumadores

En la tabla 2 se muestran los resultados observados para el gen CHRNA3 en controles y fumadores expresando la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en forma numérica y como porcentajes.

Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general no fumadora se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ($p=0,792$). Una vez comprobada esta representatividad se ha procedido al estudio comparativo de la distribución del gen CHRNA3 tanto en el grupo de controles como en el de fumadores, así como a estudiar la influencia de las variables género y edad en dicha distribución.

CHRNA3	CONTROLES N (%)	FUMADORES N (%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo A	361 (38,6%)	477 (47,1%)	1,18 (1,08;1,28)	0,000
Alelo G	573 (61,4%)	537 (52,9%)		
Homocigoto AA	69 (14,8%)	109 (21,5%)		0,001
Heterocigoto AG	223 (47,8%)	259 (51,1%)		
Homocigoto GG	175 (37,5%)	139 (27,4%)		

Tabla 2.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles).

Se ha podido observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos y de los genotipos entre el grupo control y el grupo de fumadores.

El alelo A es significativamente más frecuente en fumadores (47,1% versus 38,6%) y el G lo es en controles (61,4% versus 52,9%). Ello significa que ser portador del alelo A parece estar relacionado con la dependencia nicotínica. El genotipo homocigoto AA es significativamente más frecuente en fumadores (21,5% versus 14,8%) y el GG lo es en el grupo de controles (37,5% versus 27,4%), lo que puede interpretarse también como que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto AA constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que en sentido contrario el genotipo homocigoto GG puede actuar con un factor protector frente al tabaquismo.

2.2.- Estudio del gen *CHRNA3* para las variables de género y edad

Por grupos de edad el porcentaje mayor de fumadores se encuentra en el grupo de 40 a 60 años, seguido por el grupo de edad \leq a 40 años, existiendo un menor número de fumadores en el grupo mayor de 60 años, como ya hemos señalado con anterioridad posiblemente porque los efectos del tabaco sobre la salud son más notorios en edades avanzadas o por el hecho de que los fumadores hayan ido falleciendo o abandonando el tabaco como consecuencia de las enfermedades producidas por el mismo.

Antes de comparar ambos grupos se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general) para cada uno de los grupos de edad ($p=0,542$, $p=0,695$ y $p=0,490$) y también para el género ($p=0,364$ y $p=0,605$) por lo que cualquiera de los grupos de controles en función de la edad o el género pueden considerarse así mismo representativos de la población general no fumadora.

En la tablas 3 y 4 se exponen las frecuencias alélicas y genotípicas en función de las variables género y edad.

	CHRNA3	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC 95%)	P
HOMBRES	Alelo A	122 (38,5%)	263 (48,5%)	1,15 (1,04; 1,28)	0,006
	Alelo G	192 (61,2%)	279 (51,5%)	1	
	Homocigoto AA	21 (13,5%)	61 (22,4%)	0,019	
	Heterocigoto AG	80 (50,9%)	141 (52,1%)		
	Homocigoto GG	56 (35,6%)	69 (25,5%)		
MUJERES	Alelo A	239 (38,5%)	214 (45,4%)	1,17 (1,02; 1,34)	0,024
	Alelo G	381 (61,5%)	258 (54,6%)	1	
	Homocigoto AA	48 (15,5%)	48 (20,4%)	0,076	
	Heterocigoto AG	143 (46,1%)	118 (50%)		
	Homocigoto GG	119 (38,4%)	70 (29,6%)		

Tabla 3.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.

Como se observa en la tabla 3, el alelo A es significativamente más frecuente en varones fumadores que en varones no fumadores ($p=0,006$), mientras que en mujeres esta asociación es más débil aunque significativa ($p=0,024$). En el estudio de los genotipos se observan también diferencias entre controles y fumadores en el grupo de hombres ($p=0,019$) pero no en el de mujeres ($p=0,076$).

	CHRNA3	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC del 95 %)	P
<40 años	Alelo A	142 (35,8%)	193 (45,1%)	1,20 (1,05; 1,36)	0,007
	Alelo G	254 (64,2%)	235 (54,9%)	1	
	Homocigoto AA	23 (11,7%)	42 (19,8%)		0,028
	Heterocigoto AG	94 (47,7%)	105 (49,5%)		
	Homocigoto GG	80 (40,6%)	65 (30,7%)		
41-60 años	Alelo A	115 (40,2%)	254 (49,0%)	1,13 (1,02; 1,269)	0,016
	Alelo G	171 (59,8%)	264 (51,0%)	1	
	Homocigoto AA	22 (15,4%)	59 (22,8%)		0,048
	Heterocigoto AG	71 (49,6%)	136 (52,5%)		
	Homocigoto GG	50 (35,0%)	64 (24,7%)		
>61 años	Alelo A	106 (41,7%)	34 (47,2%)	1,19 (0,79; 1,79)	0,406
	Alelo G	148 (58,3%)	38 (52,8%)	1	
	Homocigoto AA	24 (18,7%)	8 (22,2%)		0,685
	Heterocigoto AG	58 (45,3%)	18 (50%)		
	Homocigoto GG	45 (35,0%)	10 (27,8%)		

Tabla 4 .- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.

Como se observa en la tabla 4, el alelo A es significativamente más frecuente en fumadores de los grupos con edad ≤ 40 años ($p=0,007$) y 41 a 60 años ($p=0,016$) y no alcanza significación estadística en el grupo de mayores de 61 años ($p=0,406$). Al igual que sucede con los alelos el análisis de los genotipos en función de la edad muestra diferencias entre controles y fumadores en los grupos con edad inferior a 40 años ($p=0,028$) y de 41 a 60 años ($p=0,048$), pero no en mayores de 60 años ($p=0,685$).

Un aspecto importante es conocer los grupos de edad donde se observa una mayor prevalencia del alelo A y genotipo homocigoto AA, como población posiblemente más susceptible al tabaquismo para poder actuar preferentemente sobre ellos, impidiendo el inicio del consumo de tabaco o favoreciendo su abandono una vez iniciado.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente -el alelo G- como referencia se observa que tanto el genotipo heterocigoto AG como el genotipo homocigoto AA se relacionan con la condición de fumador. La presencia del genotipo heterocigoto AG multiplica por 1,43 las probabilidades

de ser fumador y la existencia del genotipo homocigoto AA las multiplica por 2,03. En ambos casos se alcanza significación estadística ($p < 0,05$), aunque solo los resultados del genotipo AA son altamente significativos ($p = 0,000$). Ello refuerza los resultados ya señalados anteriormente de que ser portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador y la presencia del alelo A multiplica por 1,42 la probabilidad de ser fumador y con resultados altamente significativos ($p = 0,000$), como se aprecia en la tabla 5.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA3 Homocigoto AA^b	69/467 (14,8)	109/507 (21,5)	2,03 (1,38-2,98)	0,000
Heterocigoto AG^b	223/467 (47,8)	259/507 (51,1)	1,43 (1,06-1,91)	0,018
Alelo CHRNA3/A^c	38,65	47,04	1,42 (1,18-1,72)	0,000

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad y sexo (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad y sexo

Tabla 5.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.

En la tabla 6 se analiza el modelo de herencia, apreciándose que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, prácticamente el doble en el caso del codominante (2,03), 1,56 veces más en el dominante y 0,61 veces menos en el recesivo y en los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado.

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
Codominante	GG	175 (55,7)	139 (44,3)	1		
	AG	223 (46,3)	259 (53,7)	1,43	1,06-1,91	0,018
	AA	69 (38,8)	109 (61,2)	2,03	1,38-2,98	0,000
Dominante	GG	175 (55,7)	139 (44,3)	1		
	AG-AA	292 (44,2)	368 (55,8)	1,56	1,19-2,07	0,002
Recesivo	AA	69 (38,8)	109 (61,2)	1		
	AG-GG	398 (50,0)	398 (50,0)	0,61	0,43-0,86	0,005

Tabla 6.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA3 en función del modelo de herencia.

2.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo

Tanto para el grupo de los hombres como para el grupo de las mujeres, solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o control, como se aprecia en las tablas 7 y 8. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto GG con el homocigoto AA se puede comprobar como se multiplican por 2,34 en el grupo de los hombres y por 1,83 en el de las mujeres las probabilidades de ser fumador. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto GG con el heterocigoto AG se observa también como las probabilidades de ser fumador se multiplican por 1,43 en el grupo de los hombres y 1,44 en el grupo de las mujeres. A pesar de estos

resultados únicamente en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística ($p=0,006$ vs $p=0,020$) en hombres y mujeres. Ello refuerza los resultados anteriormente señalados de que ser portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA3				
Homocigoto AA^b	21/157 (13,4)	61/271 (22,5)	2,34 (1,27-4,30)	0,006
Heterocigoto AG^b	80/157 (51,0)	141/271 (52,0)	1,43 (0,91-2,23)	0,117
Alelo CHRNA3/A^c	38,85	48,52	1,51 (1,13-2,03)	0,006

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad

Tabla 7.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA3				
Homocigoto AA^b	48/310 (15,5)	48/236 (20,3)	1,83 (1,10-3,05)	0,020
Heterocigoto AG^b	143/310 (46,1)	118/236 (50,0)	1,44 (0,97-2,12)	0,068
Alelo CHRNA3/A^c	38,55	45,34	1,37 (1,07-1,75)	0,014

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad

Tabla 8.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.

El análisis de los alelos permite observar que la presencia del alelo A multiplica por 1,51 en el caso de los hombres y en 1,37 en el caso de las mujeres la probabilidad de ser fumador, siendo estos resultados altamente significativos ($p=0,006$) para el grupo de los hombres y significativos ($p=0,014$) para el grupo de las mujeres.

En la tabla 9 se analizan los modelos de herencia por separado para el grupo de los hombres y el de las mujeres. En el grupo de los hombres se observa que tanto en el modelo dominante como en el codominante, los individuos AA tienen aumentado de ser fumadores, más de dos veces (2,34) en el codominante, 1,62 veces más en el dominante y 0,53 en el recesivo. En los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia sería el adecuado.

Para el grupo de las mujeres, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores que es de 1,83 veces más en el caso del codominante, 1,53 veces más en el dominante y 0,67 veces menos en el recesivo, aunque únicamente se alcanza

significación estadística en los modelos codominante ($p=0,020$) y dominante ($p=0,023$).

HOMBRES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante	GG		56 (44,8)	69 (55,2)	1	
AG			80 (36,2)	141 (63,8)	1,43	0,91-2,23	0,117
AA			21 (25,6)	61 (74,4)	2,34	1,27-4,30	0,006
Dominante	GG		56 (44,8)	69 (55,2)	1		
	AG-AA		101 (33,3)	202 (66,7)	1,62	1,06-2,48	0,027
Recesivo	AA		21 (25,6)	61 (74,4)	1		
	AG-GG		136 (39,3)	210 (60,7)	0,53	0,31-0,92	0,024

MUJERES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante	GG		119 (63,0)	70 (37,0)	1	
AG			143 (54,8)	118 (45,2)	1,44	0,97-2,12	0,068
AA			48 (50)	48 (50)	1,83	1,10-3,05	0,020
Dominante	GG		119 (63,0)	70 (37,0)	1		
	AG-AA		191 (53,5)	166 (46,5)	1,53	1,06-2,22	0,023
Recesivo	AA		48 (50,0)	48 (50,0)	1		
	AG-GG		262 (58,2)	188 (41,8)	0,67	0,43-1,06	0,089

Tabla 9.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA3* en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.

2.4- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad

Al realizar un análisis de regresión logística, considerando al alelo más frecuente -el alelo G- como referencia, solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o de control para los individuos con edad ≤ 40 años y con los de edades comprendidas entre 41 y 60 años. Estos resultados se recogen en la tabla 10.

La presencia del genotipo homocigoto AA y del heterocigoto AG multiplican por 2,25 y 1,36 respectivamente las probabilidades de ser fumador para los individuos de edad ≤ 40 años y por 1,91 y 1,44 entre los 41 años y 60 años, aunque solo en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística ($p=0,009$; 0,045). Ello refuerza los resultados ya señalados de que se portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador para este grupo de edad. Para los individuos mayores de 60 años, los resultados no son estadísticamente significativos (tabla 10).

El cuanto a la presencia del alelo A, éste multiplica por 1,47 en el caso de los sujetos con edad ≤ 40 años y en 1,39 en el caso de los individuos con edades comprendidas entre 41 y 60 años, la probabilidad de ser fumador. Los resultados muestran significación estadística muy elevada ($p=0,009$) para el primer grupo y significativa ($p=0,038$) para el segundo.

		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
<40	CHRNA3 Homocigoto AA ^b	23/197 (11,7)	42/212 (19,8)	2,25 (1,23-4,13)	0,009
	Heterocigoto AG ^b	94/197 (47,7)	105/212 (49,5)	1,36 (0,88-2,09)	0,166
	Alelo CHRNA3/A ^c	35,85	45,09	1,47 (1,10-1,96)	0,009
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
41-60	CHRNA3 Homocigoto AA ^b	22/143 (15,4)	59/259 (22,8)	1,91 (1,01-3,58)	0,045
	Heterocigoto AG ^b	71/143 (49,7)	136/259 (52,5)	1,44 (0,89-2,33)	0,139
	Alelo CHRNA3/A ^c	40,21	49,03	1,39 (1,02-1,89)	0,038
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
>61	CHRNA3 Homocigoto AA ^b	24/127 (18,9)	8/36 (22,2)	1,61 (0,51-5,01)	0,414
	Heterocigoto AG ^b	58/127 (45,7)	18/36 (50,0)	1,22 (0,48-3,08)	0,676
	Alelo CHRNA3/A ^c	41,73	47,22	1,26 (0,72-2,22)	0,419

- Considerando la corrección de Bonferoni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por sexo (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por sexo

Tabla 10.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.

En la tabla 11 se analizan los modelos de herencia para los tres grupos de edad que hemos seleccionado. Para los individuos con edad ≤ 40 años se aprecia que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: más del doble en el codominante, 1,53 veces más en el dominante y 0,53 veces menos en el recesivo y en los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado.

Para los individuos con edades comprendidas entre los 41 y 60 años, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,91 veces más en el más en el caso del codominante, 1,55 veces más en el dominante y 0,66 veces menos en el recesivo, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p > 0,05$).

Para los individuos con edad igual a superior a los 61 años tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,61 veces más en el más en el caso del codominante, 1,32 veces más en el dominante y 0,70 veces menos en el recesivo no alcanzándose significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p > 0,05$). Además, de los tres grupos de edad son los que tienen los riesgos más bajos. En este grupo existe un menor número de fumadores, bien porque muchos hayan conseguido dejar de serlo o porque se hayan producido fallecimientos como consecuencia de enfermedades producidas por el consumo de tabaco.

	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	<40 años	Codominante	GG	80 (55,2)	63 (44,8)	1	
AG			93 (32,3)	195 (67,7)	1,36	0,88-2,09	0,166
AA			23 (35,4)	42 (64,6)	2,25	1,23-4,13	0,009
Dominante		GG	80 (55,2)	65 (44,8)	1		
		AG-AA	117 (44,3)	147 (55,7)	1,53	1,02-2,31	0,041
Recesivo		AA	23 (35,4)	42 (64,6)	1		
	GG-AG	174 (50,6)	170 (49,4)	0,53	0,30-0,92	0,024	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	De 41 a 60 años	Codominante	GG	50 (43,9)	64 (56,1)	1	
AG			71 (34,3)	136 (65,7)	1,44	0,89-2,33	0,139
AA			22 (27,2)	59 (72,8)	1,91	1,01-3,58	0,045
Dominante		GG	50 (43,9)	64 (56,1)	1		
		AG-AA	93 (32,2)	195 (67,7)	1,55	0,98-2,45	0,061
Recesivo		AA	22 (27,2)	59 (72,8)	1		
	GG-AG	121 (37,7)	200 (64,4)	0,66	0,38-1,15	0,142	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Más de 61 años	Codominante	GG	45 (81,8)	10 (18,2)	1	
AG			58 (76,3)	18 (23,7)	1,22	0,48-3,08	0,676
AA			24 (75,0)	8 (25,0)	1,61	0,52-5,01	0,414
Dominante		GG	45 (81,8)	10 (18,2)	1		
		AG-AA	82 (75,9)	26 (24,1)	1,32	0,55-3,16	0,532
Recesivo		AA	24 (75,0)	8 (25,0)	1		
	GG-AG	103 (77,9)	28 (21,4)	0,70	0,26-1,88	0,480	

Tabla 11.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA3* en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad.

3.- Análisis del Gen CHRNA5

3.1.- Estudio comparativo del gen CHRNA5 entre fumadores y no fumadores

En la tabla 12 se muestran los resultados observados para el gen CHRNA5 en controles y fumadores expresando la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en forma numérica y como porcentajes.

Antes de realizar el análisis de asociación, y con el fin de comprobar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general no fumadora se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ($p=0,567$). Una vez comprobada esta representatividad se ha procedido al estudio comparativo de la distribución del gen CHRNA5 tanto en el grupo de controles como en el de fumadores, así como a estudiar la influencia de las variables género y edad en dicha distribución.

CHRNA5	CONTROLES N (%)	FUMADORES N (%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo A	361 (38,6%)	471 (46,4%)	1,16 (1,07-1,27)	0,001
Alelo G	573 (61,4%)	543 (53,6%)		
Homocigoto AA	67 (14,3%)	107 (21,1%)		0,002
Heterocigoto AG	227 (48,6%)	257 (50,6%)		
Homocigoto GG	173 (37,1%)	143 (28,3%)		

Tabla 12.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles).

Se ha podido observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos y de los genotipos entre el grupo control y el grupo de fumadores.

El alelo A es significativamente más frecuente en fumadores (46,4% versus 38,6%) y el G lo es en controles (61,4% versus 53,6%). Ello significa que ser portador del alelo A parece estar relacionado con la dependencia nicotínica. El genotipo homocigoto AA es significativamente más frecuente en fumadores (21,1% versus 14,3%) y el GG lo es en el grupo de controles (37,1% versus 28,3%), lo que puede interpretarse también como que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto AA constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que en sentido contrario el genotipo homocigoto GG puede actuar con un factor protector frente al tabaquismo.

3.2.- Estudio del gen *CHRNA5* para las variables de género y edad

Por grupos de edad el porcentaje mayor de fumadores se encuentra en el grupo de 40 a 60 años, seguido por el grupo de edad \leq a 40 años, existiendo un menor número de fumadores en el grupo mayor de 60 años, posiblemente porque los efectos del tabaco sobre la salud son más notorios en edades avanzadas y como consecuencia de ello los fumadores dejan de fumar, o por el hecho de que los fumadores hayan ido falleciendo como consecuencia de las enfermedades producidas por el tabaco.

Antes de comparar ambos grupos se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general) para cada uno de los grupos de edad ($p=0,06$, $p=0,396$ y $p=0,319$) y también para el género ($p=0,262$ y $p=0,841$) por lo que cualquiera de los grupos de controles en función de la edad o el género pueden considerarse así mismo representativos de la población general no fumadora.

En la tablas 13 y 14 se exponen las frecuencias alélicas y genotípicas en función de las variables género y edad.

	CHRNA5	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC 95 %)	P
HOMBRES	Alelo A	121 (38,5%)	260 (48%)	1,15 (1,04-1,27)	0,007
	Alelo G	193 (61,5%)	282 (52%)	1	
	Homocigoto AA	20 (12,7%)	60 (22,1%)	0,021	
	Heterocigoto AG	81 (51,6%)	140 (51,7%)		
	Homocigoto GG	56 (35,7%)	71 (26,2%)		
MUJERES	Alelo A	240 (38,7%)	211 (44,7%)	1,15 (1,01-1,32)	0,046
	Alelo G	380 (61,3%)	261 (55,3%)	1	
	Homocigoto AA	47 (15,2%)	47 (19,9%)	0,138	
	Heterocigoto AG	146 (47,1%)	117 (49,6%)		
	Homocigoto GG	117 (37,7%)	72 (30,5%)		

Tabla 13.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.

Como se observa en la tabla 13, el alelo A es significativamente más frecuente en varones fumadores (48%) que en varones no fumadores (38,5%) ($p=0,007$), mientras que en el grupo de mujeres esta asociación es más débil (44,7% versus 38,7%; $p=0,046$) aunque significativa. En el estudio de los genotipos se observan también diferencias significativas entre controles y

fumadores en el grupo de hombres ($p=0,021$) pero no en el de mujeres ($p=0,138$).

	CHRNA5	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC del 95 %)	P
<40 años	Alelo A	138 (35%)	200 (45,9%)	1,23 (1,08-1,40)	0,001
	Alelo G	256 (65%)	236 (54,1%)	1	
	Homocigoto AA	20 (10,2%)	41 (19,4%)		0,011
	Heterocigoto AG	98 (49,7%)	108 (50,9%)		
	Homocigoto GG	79 (40,1%)	63 (29,7%)		
41-60 años	Alelo A	115 (40,2%)	248 (47,9%)	1,12 (1,01-1,24)	0,037
	Alelo G	171 (59,8%)	270 (52,1%)	1	
	Homocigoto AA	21 (14,7%)	59 (22,8%)		0,096
	Heterocigoto AG	73 (51%)	130 (50,2%)		
	Homocigoto GG	49 (34,3%)	70 (27,0%)		
>61 años	Alelo A	108 (42,5%)	33 (45,8%)	1,11 (0,74-1,67)	0,616
	Alelo G	146 (57,5%)	39 (54,2%)	1	
	Homocigoto AA	26 (20,5%)	7 (19,4%)		0,618
	Heterocigoto AG	56 (44,1%)	19 (52,8%)		
	Homocigoto GG	45 (35,4%)	10 (27,8%)		

Tabla 14.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.

Como se observa en la tabla 14, el alelo A es significativamente más frecuente en fumadores de los grupos con edad ≤ 40 años ($p=0,001$) y de 41 a 60 años ($p=0,037$) y no alcanza significación estadística en el grupo de mayores de 61 años ($p=0,616$). Al igual que sucede con los alelos, el análisis de los genotipos en función de la edad muestra diferencias entre controles y fumadores en los grupos con edad inferior a 40 años ($p=0,011$), pero no en el grupo de 41 a 60 años ($p=0,096$) ni en el grupo de mayores de 60 años ($p=0,618$).

Un aspecto importante es conocer los grupos de edad donde se observa una mayor prevalencia del alelo A y del genotipo homocigoto AA como población presumiblemente más susceptible al tabaquismo para poder actuar preferentemente sobre ellos, impidiendo el inicio al tabaquismo o favoreciendo su abandono una vez iniciado.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA5 Homocigoto AA^b	67/467 (14,3)	107/507 (21,1)	1,98 (1,34-2,92)	0,001
Heterocigoto AG^b	227/467 (48,6)	257/507 (50,7)	1,33 (0,99-1,78)	0,056
Alelo CHRNA5/A^c	38,65	46,45	1,39 (1,15-1,68)	0,001

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad y sexo (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad y sexo

Tabla 15.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente -el alelo G- como referencia, se observa que tanto el genotipo heterocigoto AG como el genotipo homocigoto AA se relacionan con la condición de fumador. La presencia del genotipo heterocigoto AG multiplica por 1,33 las probabilidades de ser fumador y la existencia del genotipo homocigoto AA las multiplica por 1,98. Se alcanza significación estadística con el genotipo homocigoto AA ($p=0,001$). Ello refuerza los resultados ya señalados de que ser portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador ya que como hemos señalado anteriormente la presencia del alelo A multiplica por 1,39 la probabilidad de ser fumador y ello tiene lugar con resultados altamente significativos ($p=0,001$), como se aprecia en la tabla 15.

En la tabla 16 se analiza el modelo de herencia, apreciándose que tanto en el modelo dominante como en el codominante, los individuos homocigotos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, prácticamente el doble en el caso del codominante (1,98), 1,47 veces más en el dominante y 0,60 veces menos en el recesivo y en los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado.

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo A y del genotipo homocigoto AA tienen aumentado el riesgo de ser fumadores, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
Codominante	GG	173 (54,7)	143 (45,3)	1		
	AG	227 (46,9)	257 (53,1)	1,33	0,99-1,78	0,056
	AA	67 (38,5)	107 (61,5)	1,98	1,34-2,92	0,001
Dominante	GG	173 (54,7)	143 (45,3)	1		
	AG-AA	294 (44,7)	364 (55,3)	1,47	1,12-1,94	0,006
Recesivo	AA	67 (38,5)	107 (61,5)	1		
	GG-AG	400 (50)	400 (50)	0,60	0,42-0,85	0,004

Tabla 16.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA5* en función del modelo de herencia.

3.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo

Tanto para el grupo de los hombres como para el grupo de las mujeres, solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o control, como se aprecia en las tablas 17 y 18. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto GG con el homocigoto AA se puede comprobar cómo se multiplica por 2,35 en el grupo de los hombres y por 1,80 en el de las mujeres las probabilidades de ser fumador en el caso de los homocigotos AA. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto GG con el heterocigoto AG se observa también como las probabilidades de ser fumador se multiplican por 1,36 en el grupo de los hombres y 1,30 en el grupo de las mujeres. A pesar de estos resultados únicamente en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística ($p=0,006$ vs $p=0,025$) en hombres y mujeres. Ello refuerza los resultados anteriormente señalados de que ser portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA5 Homocigoto AA^b	20/157 (12,7)	60/271 (22,1)	2,35 (1,27-4,36)	0,006
Heterocigoto AG^b	81/157 (51,6)	140/271 (51,7)	1,36 (0,87-2,12)	0,173
Alelo CHRNA5/A^c	38,5	48	1,5 (1,12-2,01)	0,007

- Considerando la corrección de Bonferoni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad

Tabla 17.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA5 Homocigoto AA^b	47/310 (15,2)	47/236 (19,9)	1,80 (1,08-3,01)	0,025
Heterocigoto AG^b	146/310 (47,1)	117/236 (49,6)	1,30 (0,88-1,92)	0,181
Alelo CHRNA5/A^c	38,7	44,7	1,34 (1,04-1,72)	0,023

- Considerando la corrección de Bonferoni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por edad

Tabla 18.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.

El análisis de los alelos permite observar que la presencia del alelo A multiplica por 1,5 en el caso de los hombres y en 1,34 en el caso de las mujeres la probabilidad de ser fumador, mostrando estos resultados valores

altamente significativos ($p=0,007$) para el grupo de los hombres y significativos ($p=0,023$) para el grupo de las mujeres.

En la tabla 19 se analizan los modelos de herencia por separado para el grupo de los hombres y el de las mujeres. En el grupo de los hombres se observa que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos homocigotos AA tienen aumentado más de dos veces (2,35) el riesgo de ser fumadores, 1,56 veces más en el dominante y 0,52 en el recesivo. En los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia sería el adecuado.

Para el grupo de las mujeres, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos homocigotos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores que es de 1,80 veces más en el más en el caso del codominante, 1,42 veces más en el dominante y 0,65 veces menos en el recesivo, aunque únicamente se alcanza significación estadística en el modelo codominante ($p=0,025$).

HOMBRES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante	GG	56 (44,1)	71 (55,9)	1		
AG		81 (36,7)	140 (63,3)	1,36	0,87-2,12	0,173	
AA		20 (25)	60 (75)	2,35	1,27-4,36	0,006	
Dominante	GG	56 (44,1)	71 (55,9)	1			
	AG-AA	101 (33,6)	200 (66,4)	1,56	1,02-2,38	0,04	
Recesivo	AA	20 (25)	60 (75)	1			
	GG-AG	137 (39,4)	211 (60,6)	0,52	0,30-0,89	0,018	
MUJERES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante	GG	117 (61,9)	72 (38,1)	1		
AG		146 (55,5)	117 (44,5)	1,30	0,88-1,92	0,181	
AA		47 (50)	47 (50)	1,80	1,08-3,01	0,025	
Dominante	GG	117 (61,9)	72 (38,1)	1			
	AG-AA	193 (54,1)	164 (45,9)	1,42	0,98-2,05	0,062	
Recesivo	AA	47 (50)	47 (50)	1			
	GG-AG	263 (58,2)	189 (41,8)	0,65	0,41-1,03	0,065	

Tabla 19.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA5* en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.

3.4.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad

Al realizar un análisis de regresión logística, considerando al alelo más frecuente -el alelo G- como referencia, solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o de control para los individuos con edad ≤ 40 años y con los de edades comprendidas entre 41 y 60 años. Estos resultados se recogen en la tabla 20.

La presencia del genotipo homocigoto AA y del heterocigoto AG multiplican por 2,53 y 1,37 respectivamente las probabilidades de ser fumador

para los individuos de edad ≤ 40 años y por 1,85 y 1,21 entre los 41 años y 60 años, aunque solo en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística ($p=0,004$) en el grupo de edad menor de 40 años. Ello refuerza los resultados ya señalados de que se portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador para este grupo de edad. Para los individuos con edades entre 41 y 60 años y para los de más de 60 años, los resultados no son estadísticamente significativos (Tabla 20).

El cuanto a la presencia del alelo A este multiplica por 1,37 en el caso de los sujetos con edad ≤ 40 años, 1,20 en el caso de los individuos con edades comprendidas entre 41 y 60 años y 1,27 en los de edad mayor de 60 años la probabilidad de ser fumador. Los resultados no muestran significación estadística.

		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
<40	CHRNA5 Homocigoto AA ^b	20/197 (10,2)	41/212 (19,3)	2,53 (1,35-4,77)	0,004
	Heterocigoto AG ^b	98/197 (49,7)	108/212 (50,9)	1,37 (0,89-2,10)	0,156
	Alelo CHRNA5/A ^c	35	45,9	1,37 (0,94-2,01)	0,106
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
41-60	CHRNA5 Homocigoto AA ^b	21/143 (14,7)	59/259 (22,8)	1,85 (0,98-3,48)	0,058
	Heterocigoto AG ^b	73/143 (51)	130/259 (50,2)	1,21 (0,75-1,95)	0,443
	Alelo CHRNA5/A ^c	40,2	47,9	1,20 (0,78-1,85)	0,399
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
>61	CHRNA5 Homocigoto AA ^b	26/127 (20,5)	7/36 (19,4)	1,37 (0,43-4,38)	0,595
	Heterocigoto AG ^b	56/127 (44,1)	19/36 (52,8)	1,30 (0,52-3,27)	0,575
	Alelo CHRNA5/A ^c	42,5	45,8	1,27 (0,54-2,99)	0,588

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por sexo (grupo de referencia homocigoto GG)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto GG; 1 = Heterocigoto AG y 2 = Homocigoto AA), ajustado por sexo

Tabla 20.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.

En la tabla 21 se analizan los modelos de herencia para los tres grupos de edad que hemos seleccionado. Para los individuos con edad ≤ 40 años se aprecia que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: más del doble en el codominante, 1,56 veces más en el dominante y 0,47 veces menos en el recesivo y en los tres casos se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado.

Para los individuos con edades comprendidas entre los 41 y 60 años, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,85 veces más en el más en el caso del codominante, 1,35 veces más en el dominante y 0,61 veces menos en el recesivo, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p>0,05$).

Para los individuos con edad igual a superior a los 61 años tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,37 veces más en el más en el caso del codominante, 1,32 veces más en el dominante y 0,86 veces menos en el recesivo, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p > 0,05$). Además, de los tres grupos de edad, son los que tienen los riesgos más bajos. En este grupo existe un menor número de fumadores, bien porque muchos hayan conseguido dejar de serlo o porque se hayan producido fallecimientos como consecuencia del tabaco.

	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	<40 años	Codominante	GG	79 (55,6)	63 (44,4)	1	
AG			98 (47,6)	108 (52,4)	1,37	0,89-2,10	0,156
AA			20 (32,8)	41 (67,2)	2,53	1,35-4,77	0,004
Dominante		GG	79 (55,6)	63 (44,4)	1		
		AG-AA	118 (44,2)	149 (55,8)	1,56	1,04-2,36	0,033
Recesivo		AA	20 (32,8)	41 (67,2)	1		
	GG-AG	177 (50,9)	172 (49,1)	0,47	0,27-,84	0,011	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	De 41 a 60 años	Codominante	GG	49 (41,2)	70 (58,8)	1	
AG			73 (36)	130 (64)	1,21	0,75-1,95	0,443
AA			21 (26,3)	59 (73,8)	1,85	0,98-3,48	0,058
Dominante		GG	49 (41,2)	70 (58,8)	1		
		AG-AA	94 (33,2)	189 (66,8)	1,35	0,86-2,13	0,196
Recesivo		AA	21 (26,3)	59 (73,8)	1		
	GG-AG	122 (37,9)	200 (62,1)	0,61	0,35-1,07	0,083	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Más de 61 años	Codominante	GG	45 (81,8)	10 (18,2)	1	
AG			56 (74,7)	19 (25,3)	1,30	0,52-3,27	0,575
AA			26 (78,8)	7 (21,2)	1,37	0,43-4,38	0,595
Dominante		GG	45 (81,8)	10 (18,2)	1		
		AG-AA	82 (75,9)	26 (24,1)	1,32	0,55-3,16	0,532
Recesivo		AA	26 (78,8)	7 (21,2)	1		
	GG-AG	101 (77,7)	29 (22,3)	0,86	0,31-2,35	0,764	

Tabla 21.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA5* en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad.

4.- Análisis del Gen CHRN4

4.1.- Estudio comparativo del gen CHRN4 entre fumadores y no fumadores

En la tabla 22 se muestran los resultados observados para el gen CHRN4 en controles y fumadores expresando la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en forma numérica y como porcentajes.

Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general no fumadora se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ($p=0,850$). Una vez comprobada esta representatividad se ha procedido al estudio comparativo de la distribución del gen CHRN4 tanto en el grupo de controles como en el de fumadores, así como a estudiar la influencia de las variables género y edad en dicha distribución.

CHRN4	CONTROLES N (%)	FUMADORES N (%)	OR (IC al 95%)	P
Alelo C	381 (40,8%)	468 (46,1%)	1,11 (1,01; 1,21) 1	0,017
Alelo T	553 (59,2%)	546 (53,9%)		
Homocigoto CC	77 (16,5%)	105 (20,7%)		0,054
Heterocigoto CT	227 (48,6%)	258 (50,9%)		
Homocigoto TT	163 (34,9%)	144 (28,4%)		

Tabla 22.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles).

Se ha podido observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos entre el grupo control y el grupo de fumadores, aunque no se han encontrado diferencias en la distribución de los genotipos.

El alelo C es significativamente más frecuente en fumadores (46,1% versus 40,8%) y el T lo es en controles (59,2% versus 53,9%). Ello significa que ser portador del alelo C parece estar relacionado con la dependencia nicotínica. El genotipo homocigoto CC es significativamente más frecuente en fumadores (20,7% versus 16,5%) y el TT lo es en el grupo de controles (34,9% versus 28,4%), lo que puede interpretarse también como que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto CC constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que en sentido contrario el genotipo homocigoto TT puede actuar con un factor protector frente al tabaquismo.

4.2.- Estudio del gen *CHRN4* para las variables de género y edad

Por grupos de edad el porcentaje mayor de fumadores se encuentra en el grupo de 40 a 60 años, seguido por el grupo de edad \leq a 40 años, existiendo un menor número de fumadores en el grupo mayor de 60 años, posiblemente porque los efectos del tabaco sobre la salud son más notorios en edades avanzadas o por el hecho de que los fumadores hayan ido falleciendo como consecuencia de las enfermedades producidas por el tabaco.

Antes de comparar ambos grupos se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles (como representantes de la población general) para cada uno de los grupos de edad ($p=0,336$, $p=0,861$ y $p=0,525$) y también para el género ($p=0,488$ y $p=0,736$) por lo que cualquiera de los grupos de controles en función de la edad o el género pueden considerarse así mismo representativos de la población general no fumadora.

En la tablas 23 y 24 se exponen las frecuencias alélicas y genotípicas en función de las variables género y edad.

	CHRN4	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC 95%)	P
HOMBRES	Alelo C	128 (40,8%)	259 (47,8%)	1,11 (1,00;1,23)	0,047
	Alelo T	186 (59,2%)	283 (52,2%)	1	
	Homocigoto CC	24 (15,4%)	61 (22,5%)	0,123	
	Heterocigoto CT	80 (50,9%)	137 (50,6%)		
	Homocigoto TT	53 (33,7%)	73 (26,9%)		
MUJERES	Alelo C	253 (40,8%)	209 (44,3%)	1,08 (0,95;1,24)	0,250
	Alelo T	367 (59,2%)	263 (55,7%)	1	
	Homocigoto CC	53 (17,1%)	44 (18,6%)	0,414	
	Heterocigoto CT	147 (47,4%)	121 (51,3%)		
	Homocigoto TT	110 (35,5%)	71 (30,1%)		

Tabla 23.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable de género.

Como se observa en la tabla 23 el alelo C es significativamente más frecuente en varones fumadores que en varones no fumadores ($p=0,047$), mientras que en mujeres esta asociación no es estadísticamente significativa ($p=0,250$). En el estudio de los genotipos, las diferencias entre los porcentajes no son estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre controles y fumadores en el grupo de hombres ($p=0,123$) ni tampoco en el de las mujeres ($p=0,414$).

El alelo C es significativamente más frecuente en fumadores de los grupos con edad ≤ 40 años y 41 a 60 años, pero en ningún grupo alcanza significación estadística ($p=0,177$, $p=0,053$ y $p=0,751$). Al igual que sucede con los alelos, el análisis de los genotipos en función de la edad, no muestra tampoco diferencias estadísticamente significativas entre controles y fumadores en ninguno de los tres grupos de edad ($p=0,367$, $p=0,152$, $p=0,627$) como se aprecia en la tabla 24.

	CHRN4	CONTROLES %	FUMADORES %	OR (IC del 95 %)	P
<40 años	Alelo C	149 (37,8%)	180 (42,4%)	1,10 (0,96;1,25)	0,177
	Alelo T	245 (62,2%)	244 (57,6%)	1	
	Homocigoto CC	25 (12,7%)	36 (17,0%)	0,367	
	Heterocigoto CT	99 (50,2%)	108 (50,9%)		
	Homocigoto TT	73 (37,1%)	68 (32,1%)		
41-60 años	Alelo C	121 (42,3%)	256 (49,4%)	1,11 (0,99;1,23)	0,053
	Alelo T	165 (57,7%)	262 (50,6%)	1	
	Homocigoto CC	26 (18,1%)	63 (24,3%)	0,152	
	Heterocigoto CT	69 (48,3%)	130 (50,2%)		
	Homocigoto TT	48 (33,6%)	66 (25,5%)		
>61 años	Alelo C	111 (43,7%)	180 (42,4%)	0,98 (0,87;1,10)	0,751
	Alelo T	143 (56,3%)	244 (57,6%)	1	
	Homocigoto CC	26 (20,5%)	6 (16,7%)	0,627	
	Heterocigoto CT	59 (46,4%)	20 (55,5%)		
	Homocigoto TT	42 (33,1%)	10 (27,8%)		

Tabla 24.- Frecuencias alélicas y genotípicas en función de la variable edad.

Un aspecto importante es conocer los grupos de edad donde se observa una mayor prevalencia del alelo C y genotipo homocigoto CC, como población presumiblemente más susceptible al tabaquismo para poder actuar preferentemente sobre ellos, impidiendo el inicio al tabaquismo o favoreciendo su abandono una vez iniciado.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA4				
Homocigoto CC^b	77/467 (16,5)	105/507 (20,7)	1,58 (1,08-2,31)	0,019
Heterocigoto CT^b	227/467 (48,6)	258/507 (50,9)	1,28 (0,95-1,71)	0,104
Alelo CHRNA4/C^c	40,79	47,04	1,26 (1,04-1,52)	0,016

- a. Considerando la corrección de Bonferoni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- b. Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad y sexo (grupo de referencia homocigoto TT)
- c. Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto TT; 1 = Heterocigoto CT y 2 = Homocigoto CC), ajustado por edad y sexo

Tabla 25.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos.

Al realizar un análisis de regresión logística, para controlar por las variables de edad y género, considerando al alelo más frecuente -el alelo T- como referencia, se observa que tanto el genotipo heterocigoto CT como el genotipo homocigoto CC se relacionan con la condición de fumador. La presencia del genotipo heterocigoto CT multiplica por 1,28 las probabilidades de ser fumador y la existencia del genotipo homocigoto CC las multiplica por 1,58. Únicamente se alcanza la significación estadística ($p < 0,05$) con el genotipo homocigoto CC ($p = 0,019$). Ello refuerza los resultados ya señalados de que ser portador del alelo C se relaciona con el hecho de ser fumador ya que como hemos señalado anteriormente la presencia del alelo C multiplica por 1,26 la probabilidad de ser fumador y con resultados altamente significativos ($p = 0,016$), como se aprecia en la tabla 25.

En la tabla 26 se analiza el modelo de herencia, apreciándose que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,58 veces en el caso del codominante, 1,35 veces en el dominante y 0,74 veces menos en el recesivo y en los dos primeros modelos de herencia se alcanza significación estadística ($p = 0,019$ y $p = 0,034$).

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo C y del genotipo homocigoto CC tienen aumentado el riesgo de ser fumadores, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
Codominante	TT	163 (53,1)	144 (46,9)	1		
	CT	227 (46,8)	258 (53,2)	1,28	0,95-1,71	0,104
	CC	77 (42,3)	105 (57,7)	1,58	1,08-2,31	0,019
Dominante	TT	163 (53,1)	144 (46,9)	1		
	CT-CC	304 (45,6)	363 (54,4)	1,35	1,02-1,78	0,034
Recesivo	CC	77 (42,3)	105 (57,7)	1		
	TT-CT	390 (49,2)	402 (50,8)	0,74	0,53-1,03	0,073

Tabla 26.- Análisis del riesgo de polimorfismo CHRNA4 en función del modelo de herencia.

4.3.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el sexo

Tanto para el grupo de los hombres como para el grupo de las mujeres, solamente el genotipo homocigoto CC aparece relacionado con la condición de fumador o control, como se aprecia en las tablas 27 y 28. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto TT con el homocigoto CC se puede comprobar cómo se multiplica por 1,83 en el grupo de los hombres y por 1,43 en el de las mujeres las probabilidades de ser fumador. Al comparar la presencia del genotipo homocigoto TT con el heterocigoto CT se observa también como las probabilidades de ser fumador se multiplican por 1,24 en el grupo de los hombres y 1,28 en el grupo de las mujeres. A pesar de estos resultados, únicamente en el caso del genotipo homocigoto CC se alcanza significación estadística ($p=0,045$) en el grupo de hombres y no en el grupo de mujeres ($p=0,173$). Ello refuerza los resultados anteriormente señalados de que ser portador del alelo C se relaciona con el hecho de ser fumador en hombres.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA4				
Homocigoto CC^b	24/157 (15,3)	61/271 (22,5)	1,83 (1,01-3,31)	0,045
Heterocigoto CT^b	80/157 (50,9)	137/271 (50,5)	1,24 (0,79-1,94)	0,356
Alelo CHRNA4/C^c	40,76	47,78	1,33 (1,00-1,78)	0,049

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto TT)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto TT; 1 = Heterocigoto CT y 2 = Homocigoto CC), ajustado por edad

Tabla 27.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de los hombres.

	Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
CHRNA4				
Homocigoto CC^b	53/310 (17,1)	44/236 (18,6)	1,43 (0,86-2,38)	0,173
Heterocigoto CT^b	147/310 (47,4)	121/236 (51,3)	1,28 (0,86-1,88)	0,221
Alelo CHRNA4/C^c	40,81	44,28	1,21 (0,94-1,55)	0,139

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas.
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por edad (grupo de referencia homocigoto TT)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto TT; 1 = Heterocigoto CT y 2 = Homocigoto CC), ajustado por edad

Tabla 28.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el grupo de las mujeres.

El análisis de los alelos permite observar que la presencia del alelo C multiplica por 1,33 en el caso de los hombres y en 1,21 en el caso de las mujeres la probabilidad de ser fumador, mostrando estos resultados significación estadística ($p=0,049$) para el grupo de los hombres y no para el grupo de mujeres ($p=0,139$).

En la tabla 29 se analizan los modelos de herencia por separado para el grupo de los hombres y el de las mujeres. En el grupo de los hombres se observa que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, un 1,83 veces más en el codominante, 1,37 veces más en el dominante y 0,62 en el recesivo. Únicamente se alcanza la significación estadística en el modelo codominante, por lo que no podemos sugerir que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado.

Para el grupo de mujeres, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores que es de 1,43 veces más en el más en el caso del codominante, 1,31 veces más en el dominante y 0,81 veces menos en el recesivo, y en ninguno de los modelos se alcanza significación estadística.

HOMBRES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante		TT	53 (42,1)	73 (57,9)	1	
		CT	80 (36,9)	137 (63,1)	1,24	0,79-1,94	0,356
		CC	24 (28,2)	61 (71,8)	1,83	1,01-3,31	0,045
Dominante		TT	53 (42,1)	73 (57,9)	1		
		CT-CC	104 (34,4)	198 (65,6)	1,37	0,89-2,10	0,146
Recesivo		CC	24 (28,2)	61 (71,8)	1		
		TT-CT	133 (38,8)	210 (61,2)	0,62	0,37-1,05	0,076
MUJERES	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Codominante		TT	110 (60,8)	71 (39,2)	1	
		CT	147 (54,9)	121 (45,1)	1,28	0,86-1,88	0,221
		CC	53 (54,6)	44 (45,4)	1,43	0,86-2,38	0,173
Dominante		TT	110 (60,8)	71 (39,2)	1		
		CT-CC	200 (54,8)	165 (45,2)	1,31	0,91-1,90	0,148
Recesivo		CC	53 (54,6)	44 (45,4)	1		
		TT-CT	257 (57,2)	192 (42,8)	0,81	0,51-1,28	0,365

Tabla 29.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA4* en función del modelo de herencia para el grupo de hombres y el de mujeres.

4.4.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad.

Al realizar un análisis de regresión logística, considerando al alelo más frecuente -el alelo T- como referencia, solamente el genotipo homocigoto CC aparece relacionado con la condición de fumador o de control. Estos resultados se recogen en la tabla 30.

La presencia del genotipo homocigoto CC y del heterocigoto CT multiplican por 1,52 y 1,17 respectivamente las probabilidades de ser fumador para los individuos de edad ≤ 40 años, por 1,68 y 1,35 entre los 41 años y 60 años y por 0,99 y 1,15 en > 61 años, no alcanzando significación estadística en ninguno de los grupos de edad.

El cuanto a la presencia del alelo C, éste multiplica por 1,22 en el caso de los sujetos con edad ≤ 40 años y en 1,30 en el caso de los individuos con edades comprendidas entre 41 y 60 años, y 1,02 en > 61 años la probabilidad de ser fumador. Los resultados no muestran significación estadística en ninguno de los grupos.

		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
<40	CHRNA4				
	Homocigoto CC ^b	25/197 (12,7)	36/212 (16,9)	1,52 (0,83-2,78)	0,178
	Heterocigoto CT ^b	99/197 (50,2)	108/212 (50,9)	1,17 (0,76-1,80)	0,475
Alelo CHRNA4/C ^c		37,81	42,45	1,22 (0,91-1,63)	0,182
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
41-60	CHRNA4				
	Homocigoto CC ^b	26/143 (18,2)	63/259 (24,3)	1,68 (0,91-3,08)	0,094
	Heterocigoto CT ^b	69/143 (48,2)	130/259 (50,1)	1,35 (0,89-2,21)	0,221
Alelo CHRNA4/C ^c		42,3	49,42	1,30 (0,96-1,76)	0,086
		Controles; n/N (%)	Casos; n/N (%)	OR (IC del 95 %)	p ^a
>61	CHRNA4				
	Homocigoto CC ^b	26/127 (20,5)	6/36 (16,7)	0,99 (0,30-3,32)	0,996
	Heterocigoto CT ^b	59/127 (46,4)	20/36 (55,5)	1,15 (0,46-2,89)	0,766
Alelo CHRNA4/C ^c		43,7	42,4	1,02 (0,57-1,82)	0,955

- Considerando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, valores $p < 0,025$ se consideraron estadísticamente significativas
- Regresión logística multivariante del genotipo ajustada por sexo (grupo de referencia homocigoto TT)
- Regresión logística multivariante del alelo A como variable continua (0 = homocigoto TT; 1 = Heterocigoto CT y 2 = Homocigoto CC), ajustado por sexo

Tabla 30.- Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas estudiadas en fumadores (casos) y no fumadores (controles) y análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para los tres grupos de edad.

En la tabla 31 se analizan los modelos de herencia para los tres grupos de edad que hemos seleccionado. Para los individuos con edad ≤ 40 años se aprecia que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,52 veces más en el codominante, 1,24 veces más en el dominante y 0,72 veces menos en el recesivo, pero en ninguno de los tres casos se alcanza la significación estadística, no pudiendo afirmar que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado.

Para los individuos con edades comprendidas entre los 41 y 60 años, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores: 1,68 veces más en el más en el caso del codominante, 1,44 veces más en el dominante y 0,72 veces menos en el recesivo, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p > 0,05$) no pudiendo afirmar que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado.

Para los individuos con edad superior a los 60 años tan sólo para el modelo dominante los individuos CC tiene un riesgo aumentado de ser fumadores, 1,10 veces más, no alcanzándose significación estadística para dicho modelo ($p = 0,819$).

	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	<40 años	Codominante	TT	73 (51,8)	68 (48,2)	1	
CT			99 (47,8)	108 (52,2)	1,17	0,76-1,80	0,475
CC			25 (41)	36 (59)	1,52	0,83-2,78	0,178
Dominante		TT	73 (51,8)	68 (48,2)	1		
		CT-CC	124 (46,3)	144 (53,7)	1,24	0,82-1,87	0,302
Recesivo		CC	25 (41)	36 (59)	1		
	TT-CT	172 (49,4)	176 (50,6)	0,72	0,41-1,26	0,249	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	De 41 a 60 años	Codominante	TT	48 (42,1)	66 (57,9)	1	
CT			69 (34,7)	130 (65,3)	1,35	0,89-2,21	0,221
CC			26 (29,2)	63 (70,8)	1,68	0,91-3,08	0,094
Dominante		TT	48 (42,1)	66 (57,9)	1		
		CT-CC	95 (33)	193 (67)	1,44	0,91-2,29	0,117
Recesivo		CC	26 (29,2)	63 (70,8)	1		
	TT-CT	117 (37,4)	196 (62,6)	0,72	0,43-1,22	0,223	
	Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95 %	P
	Más de 61 años	Codominante	TT	42 (80,8)	10 (19,2)	1	
CT			59 (74,7)	20 (25,3)	1,15	0,46-2,89	0,766
CC			45 (81,8)	6 (18,8)	0,99	0,30-3,32	0,996
Dominante		TT	42 (80,8)	10 (19,2)	1		
		CT-CC	85 (76,6)	26 (23,4)	1,11	0,46-2,67	0,819
Recesivo		CC	26 (81,3)	6 (18,8)	1		
	TT-CT	101 (77,1)	30 (22,9)	1,10	0,38-3,13	0,863	

Tabla 31.- Análisis del riesgo de polimorfismo *CHRNA4* en función del modelo de herencia para los diferentes grupos de edad.

DISCUSIÓN

1.- Generalidades

El tabaco es conocido por la civilización occidental desde finales del siglo XV, en el que se observó su uso por los aborígenes del Caribe durante el descubrimiento de América³⁰². El incremento del consumo de tabaco está relacionado con la industrialización y manufacturación del mismo, la accesibilidad del producto y la publicidad. A partir de 1950 se publican los primeros estudios acerca de los efectos perjudiciales para la salud producidos por su consumo³⁰³. Las enfermedades relacionadas con el tabaco son una importante causa de muerte, tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud estima que si continúan las tendencias actuales el número anual de muertes por enfermedades relacionadas con el tabaco se duplicará, pasando de cinco millones en el año 2000 a diez millones en el 2020³⁰⁴.

Los cigarrillos son la forma predominante de consumo de tabaco utilizada en todo el mundo, y durante los últimos años se han señalado a factores genéticos como determinantes de la dependencia a la nicotina, con estimaciones de la heredabilidad que oscilan según los diversos autores desde el 44 hasta el 60%¹⁶³. Los esfuerzos para identificar locus de susceptibilidad que influyen en el comportamiento del consumo de cigarrillos a través de estudios de asociación se han llevado a cabo con genes candidatos en casos y controles, y también mediante estudios familiares.

Desde hace años se investiga la contribución de diversos genes a la dependencia nicotínica y su influencia en las diferentes actitudes ante el tabaco que se observan en distintos fumadores. Existe un interés creciente en el estudio de las implicaciones genéticas de la dependencia nicotínica, en parte como solución a un problema personal de cada fumador y también como un problema de salud pública que produce importantes costes sanitarios y sociales.

La posibilidad de llegar a ser fumador, entendida como susceptibilidad al tabaco, se debe a la unión de factores ambientales y genéticos. Los primeros son ampliamente conocidos y los segundos son objeto de investigación. Estos últimos pueden ser debidos a múltiples genes, que son conocidos como genes de susceptibilidad, y que aportan al individuo que los posee un riesgo añadido para llegar a realizar una conducta, pero que por si solos son insuficientes para producirla.

La combinación de factores genéticos, neurobiológicos y del comportamiento dan como resultado la adopción de la conducta fumadora. El papel de los genes en dicha combinación no es aún suficientemente conocido, aunque las investigaciones recientes sugieren que esta susceptibilidad genética no están vinculada a uno o dos genes, sino que posiblemente es el resultado de la implicación de distintos genes, que según algunos autores estarían implicados en la dependencia a diversas sustancias y según otros

podrían existir genes específicos de algunas de estas dependencias, siendo el caso de la dependencia nicotínica.

Los criterios para la selección de los genes candidatos se basa en los conocimientos actuales de neurobiología, y tienen en cuenta los conocimientos ya aceptados sobre la genética de la dependencia a la nicotina y también otras características asociadas que podrían definirse como los fenotipos observados en fumadores. La caracterización de nuevos polimorfismos del genoma está permitiendo asociar regiones cromosómicas con caracteres fenotípicos propios de fumadores. Diversos estudios han permitido localizar varias regiones del genoma, en los cromosomas 2, 5, 9, 11, 17, 19, 22 y X, que pueden estar implicadas en el metabolismo de la nicotina y la adicción al tabaco.

Se piensa que las variaciones genéticas son determinantes en la conducta del fumador, en su dependencia, en la mayor o menor severidad de su adicción a la nicotina, y por tanto, en su mayor o menor dificultad para abandonar el consumo de tabaco una vez iniciado este y establecida su dependencia nicotínica. Dado que estas variantes podrían también determinar la respuesta a los tratamientos farmacológicos para dejar de fumar, es probable que el estudio de dichas variaciones pueda llegar a ser una herramienta prometedora para el diseño de nuevos fármacos e incluso para poder llegar a individualizar el tratamiento farmacológico para cada tipo de fumador.

Con este objetivo se han estudiado numerosos genes, principalmente relacionados con el metabolismo de la nicotina y con diversos mediadores neurológicos, especialmente la dopamina. En los últimos años diversos estudios señalan que en el cromosoma 15q25.1 existe un grupo de genes colinérgicos *CHRNA3A5B4* fuertemente asociados con la dependencia nicotínica^{222,223,229,251,252}. Por ello nuestro estudio se ha centrado en el análisis de variaciones alélicas y genotípicas de los genes colinérgicos *CHRNA3A5B4* que, como han señalado diversos autores, parecen estar implicados en el proceso de adicción a la nicotina.

2.- Análisis de las características de los sujetos incluidos en el estudio

En nuestro estudio se han incluido 507 fumadores procedentes de la Unidad Funcional de Tabaquismo del Hospital Universitario de Salamanca, a los cuales tras la realización del diagnóstico del tabaquismo se les propuso un tratamiento multicomponente. Del total de los fumadores, 271 (53,5%) eran varones y 236 (46,5%) mujeres, como se puede apreciar en la tabla 1.

Se reclutaron 467 controles, 157 (33,6%) varones y 310 (66,4%) mujeres, en distintas consultas especializadas del Hospital Universitario de Salamanca y en centros de Atención Primaria del Área de Salud de Salamanca (tabla 1) siendo necesario señalar que el criterio de “nunca fumadores” dificultó considerablemente la selección de los controles y, posiblemente, influyó también en el sesgo de género observado dentro de este grupo.

Al estudiar la población objeto de estudio se puede observar que la distribución de los sujetos en función de la variable género presenta algunas diferencias entre controles y fumadores (predominio de varones entre los fumadores: 53,5% frente a 46,5%, y de mujeres entre los controles: 66,4% frente a 33,6%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (tabla 1). El predominio de varones se puede explicar por el hecho de la mayor prevalencia del tabaquismo entre los varones (34% frente al 24%) según la última Encuesta Nacional de Salud del 2009, y también por el hecho aún no contrastado suficientemente, de que entre la población fumadora son porcentualmente más el número de varones que se plantea deja de fumar.

A lo largo del tiempo, la epidemia de tabaquismo ha sido diferente en hombres y mujeres, pese a que la nicotina, sustancia responsable de mantener la adicción al tabaco, sea igual para ambos. Sin embargo, existen diversos factores, aparte de las características propias de la nicotina, que influyen de modo diferente en ambos sexos y que favorecen el desarrollo y mantenimiento de la adicción, como por ejemplo, los factores genéticos estudiados en este trabajo. En nuestro país actualmente existe un elevado porcentaje de mujeres que fuman. La incorporación de la mujer al consumo de tabaco tiene consecuencias no sólo sobre su salud, sino también sobre la salud del feto y del recién nacido en caso de mujeres embarazadas. Por tanto es muy importante conocer los factores que diferencian el consumo de tabaco en las mujeres para su prevención.

En España nos encontramos en la fase III de la epidemia tabáquica según el modelo de López y cols.³⁰¹ donde se observa un descenso del consumo entre los varones y un incremento entre las mujeres (que no alcanzan los niveles máximos de consumo observados en el pasado entre los varones), como se aprecia en la figura 9. Probablemente el consumo de tabaco entre las mujeres nunca llegue a ser tan elevado como lo fue en los hombres, debido a que el mejor conocimiento de las consecuencias del consumo de cigarrillos sobre la salud ha puesto en marcha fuertes políticas de prevención y control del tabaquismo, incluso con un diseño específico hacia las mujeres, que están limitando la prevalencia del consumo en la población adulta, tanto entre los hombres como entre las mujeres.

Esta misma circunstancia se puede observar cuando se analiza la población por grupos de edad: en el grupo de no fumadores la proporción de mayores de 61 años es superior (casi 4 veces más) que en el grupo de fumadores. Sin embargo, el grupo de edad entre 41- 60 años incluye más de la mitad de todos los individuos fumadores estudiados (51,1%), mientras que en este intervalo de edad los no fumadores suponen el 30,6% del total del grupo control.

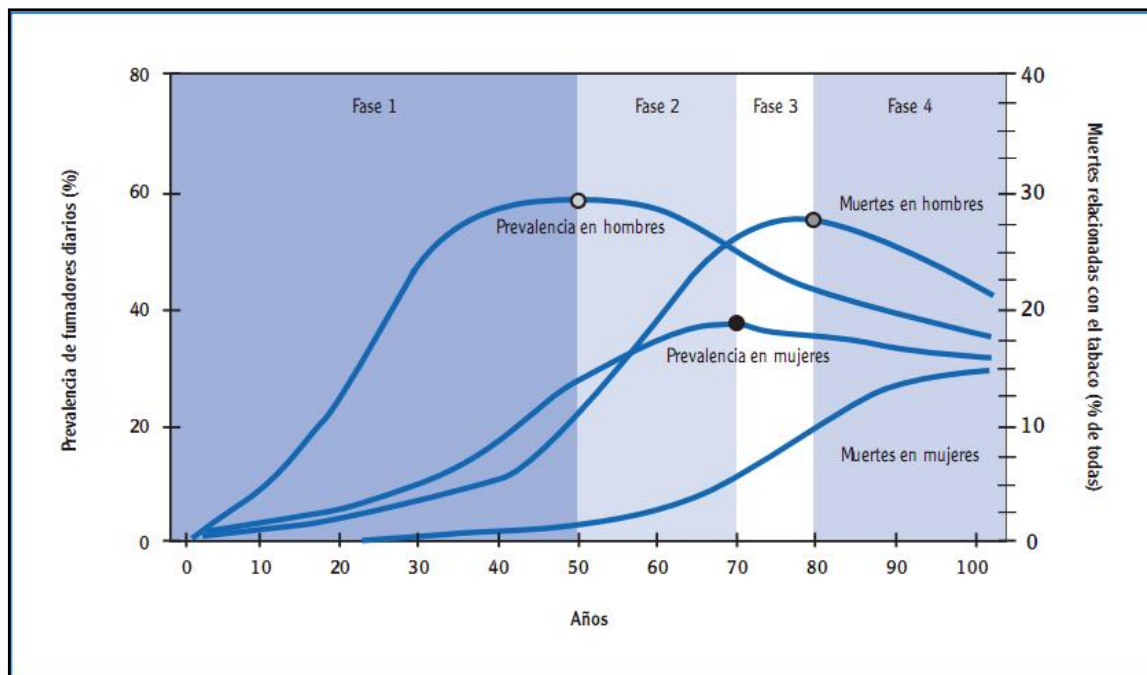


Figura 9.- Modelos de la epidemia tabáquica según López et al.³⁰¹ disponible en <http://www.neumomadrid.org/images/upload/Tabaco.pdf>.

En relación con la población mayor de 61 años, el predominio de los no fumadores posiblemente se explica por factores como la mayor mortalidad de los fumadores frente a la mayor supervivencia de los no fumadores. En el caso del predominio de fumadores en el segmento de edad comprendido entre 41 y 60 años posiblemente se explica porque este es precisamente el segmento de edad en el que más fumadores se plantean dejar de fumar y por ello, son también el grupo que habitualmente solicita más apoyo para dejar de fumar, lo que justifica el sesgo existente entre fumadores y controles y el agrupamiento de los fumadores dentro de este segmento de edad, dado que la selección del grupo de fumadores se realizó en una UET.

Para poder conocer si la población fumadora y el grupo control eran representativos de la distribución de fumadores y no fumadores dentro de la población general, se realizó el estudio estadístico de ambas poblaciones mediante el estudio de equilibrio de poblaciones de Hardy-Weinberg que nos permitió comprobar la representatividad de ambos grupos respecto de la población general no fumadora y fumadora y que por tanto da validez a los resultados obtenidos.

3.- Características de los genes colinérgicos a estudio

Nuestro estudio se basa en el análisis de polimorfismos genéticos que como se sabe, son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades³⁰⁵. Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de “alta penetrancia”, ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad. También se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, y para que dicha variante genética se exprese, a menudo es necesaria la participación de una exposición. Los polimorfismos más frecuentes son los que estudiamos en este trabajo, que se producen por el cambio de una única base. A éstos se les llama polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism (SNP)*).

Como ya se ha señalado con anterioridad, el principal objetivo de este trabajo ha sido analizar la relación entre las variaciones genéticas los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 y el inicio al consumo de tabaco, mediante un estudio de dichos polimorfismos entre sujetos que nunca habían fumado (grupo control) y sujetos fumadores. Se realizó el estudio descriptivo del polimorfismo rs12914385 (test C__12106059__10) del gen CHRNA3, del polimorfismo rs16969968 (test C__26000428__20) del gen CHRNA5, y del polimorfismo rs17487223 (test C__32510316__10) del gen CHRNB4, calculando las frecuencias alélicas y genotípicas.

Un objetivo secundario ha sido estudiar la posible influencia de factores como el género y la edad entre la población fumadora que acude a una consulta especializada de tabaquismo, y su relación con las variaciones genéticas estudiadas. Los análisis se llevaron a cabo para investigar si varios locus genéticos estadísticamente diferentes en esta región (15q25.1) ejercen efectos independientes sobre el tabaquismo, y si existen patrones similares de riesgo genético para la dependencia nicotínica.

La estructura genómica de cada gen estudiado queda reflejada en las figuras 10 a 12.

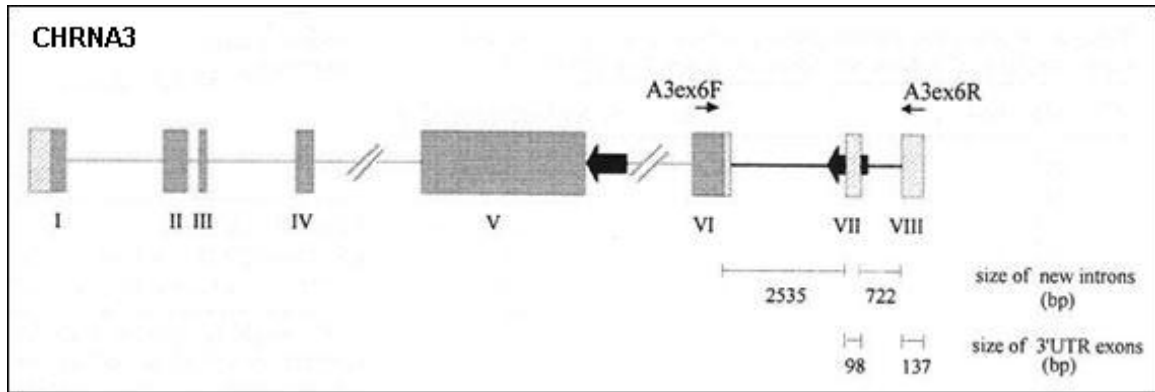


Figura 10.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\alpha 3$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNA3). Las cajas indican los exones; las líneas horizontales representan los intrones. Se muestran aquí los nuevos intrones identificados recientemente en cajas rayadas²³⁶. Las cajas en gris indican parte de la subunidad que previamente se había estudiado³⁰⁶.

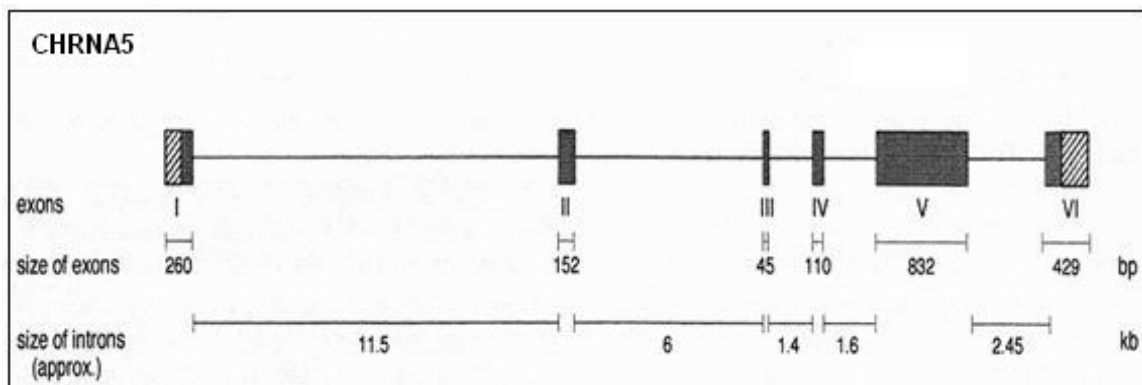


Figura 11.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\alpha 5$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNA5). El tamaño es de 25 Kb. Las cajas indican los exones; las líneas horizontales representan los intrones. Las cajas rayadas indican las regiones no traducidas 3' y 5'²³⁶.

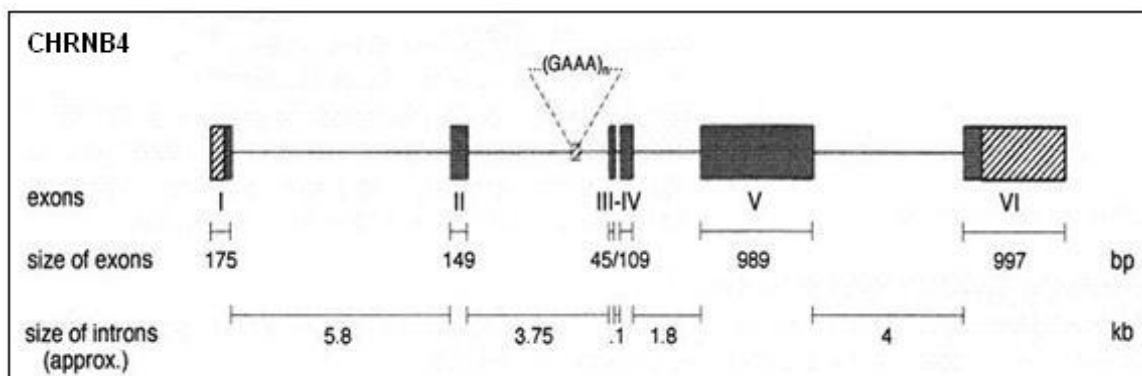


Figura 12.- Representación esquemática de la estructura genómica de la subunidad $\beta 4$ del receptor nicotínico de acetilcolina (CHRNA4). El tamaño es de 17 Kb. Las cajas indican los exones; las líneas horizontales representan los intrones. Las cajas rayadas indican las regiones no traducidas 3' y 5'. Se representa el nuevo tretranucleótido en el intron 2 descubierto recientemente²³⁶.

La elección de estos tres genes localizados en el cromosoma 15q25.1, se ha basado en la existencia en la bibliografía de evidencias científicas suficientes de su implicación en la dependencia nicotínica^{260,298}, aunque cabe señalar que los resultados publicados son diversos y, en algunos casos, contradictorios. El tabaquismo se ha relacionado con el SNP del gen CHRNA5, rs 16969968, en múltiples aspectos y en múltiples estudios, y ha sido considerada como la asociación más importante del genoma para la adicción al tabaco en varios meta-análisis recientemente publicados^{225,226,307}.

En nuestro estudio hemos podido observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencia alélicas y genotípicas entre el grupo de control y el grupo de fumadores en los genes CHRNA3 y CHRNA5, mientras que para el gen CHRNB4 las diferencias observadas no alcanzan significación estadística.

En el caso del gen CHRNA3, tal y como se refleja en la tabla 2 del apartado de resultados y de forma gráfica en la figura 13, el alelo A es significativamente más frecuente en fumadores y el G lo es en controles (p=0,000). Ello significa que ser portador del alelo A parece estar relacionado con la dependencia nicotínica.

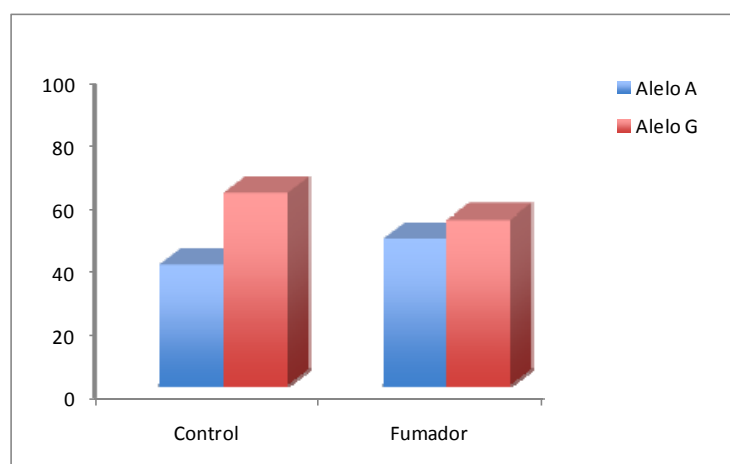


Figura 13.- Porcentajes de frecuencias alélicas del gen CHRNA3 en controles y fumadores.

El genotipo homocigoto AA es significativamente más frecuente en fumadores y el GG lo es en el grupo de controles (p=0,001) como se refleja en la figura 14, lo que puede interpretarse también como que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto AA constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que en sentido contrario, el genotipo homocigoto GG puede actuar con un factor protector frente al tabaquismo, impidiendo o limitando su consumo.

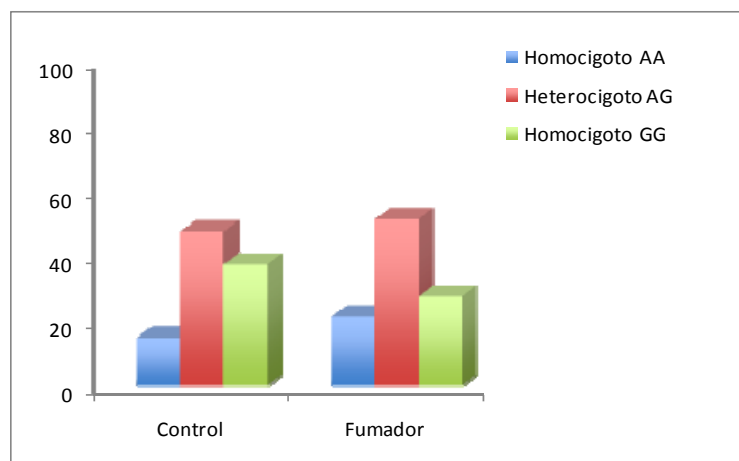


Figura 14.- Porcentajes de frecuencias genotípicas del gen *CHRNA3* en controles y fumadores.

Como ya hemos señalado en el apartado de resultados, considerando solamente al grupo de los fumadores se observan diferencias altamente significativas ($p=0,000$) en las frecuencias alélicas y genotípicas, que se pueden apreciar cuando se comparan con el grupo control (figura 15).

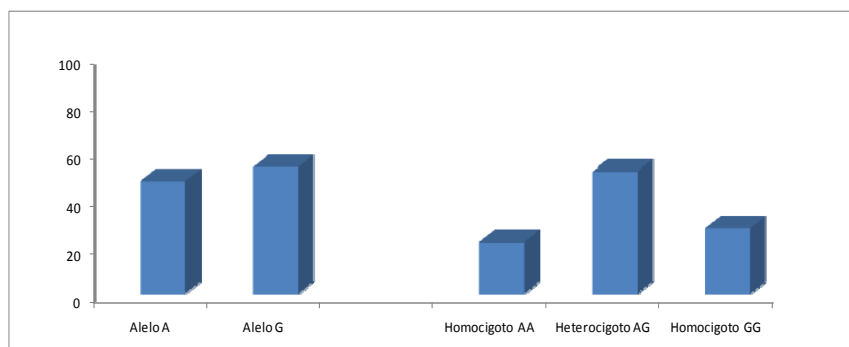


Figura 15.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *CHRNA3* en el grupo de fumadores.

El gen del receptor *CHRNA3*, no ha sido estudiado individualmente, sino que se ha estudiado en asociación a otros genes, como el bucle formado junto a *CHRNA6* y a *CHRNA5-CHRNA4*. Se han estudiado variaciones genéticas de *CHRNA3*, como la rs 1051730, dentro de la agrupación del clúster *CHRNA3A5B4* asociándola con fumadores importantes, con alto grado de tabaquismo, y con mayores probabilidades para dejar de fumar a corto tiempo³⁰⁸, lo que apoya los resultados de nuestro estudio al relacionar el gen *CHRNA3* con la dependencia nicotínica. Esta misma variante se asoció con la dependencia nicotínica en un pequeño estudio de mujeres israelíes de Greenbaum y colaboradores²⁰⁴.

Los resultados observados en nuestro estudio con el gen CHRNA5 en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, se reflejan en la tabla 12 del apartado de resultados y de forma gráfica en las figuras 16 a 18.

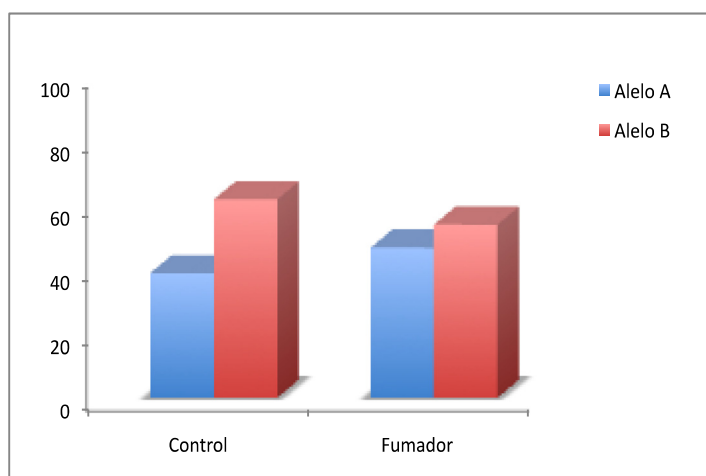


Figura 16.- Porcentajes de las frecuencias alélicas del gen CHRNA5 en controles y fumadores.

Estos resultados muestran que, al igual que sucedía en el caso del gen CHRNA3, el alelo A del gen CHRNA5 es significativamente más frecuente en el grupo de fumadores y el G lo es en el de controles ($p=0,001$).

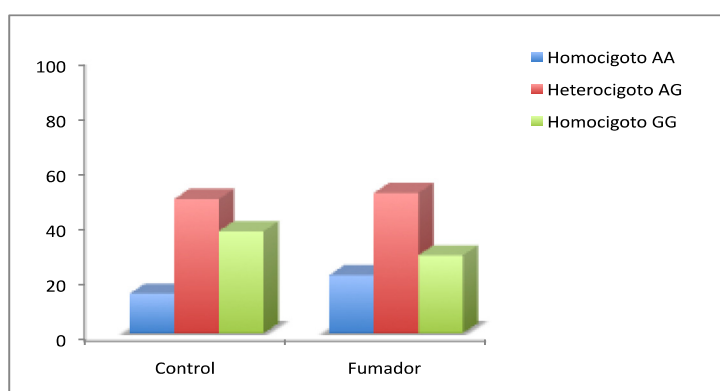


Figura 17.- Porcentajes de las frecuencias genotípicas del gen CHRNA5 en controles y fumadores.

Ello significa que ser portador del alelo A parece estar relacionado con la dependencia nicotínica, lo que puede interpretarse también como que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto AA constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que en sentido contrario el genotipo homocigoto GG puede actuar con un factor protector frente al tabaquismo, limitando o impidiendo su consumo.

Tal y como se ha señalado en el apartado de resultados y considerando solamente al grupo de los fumadores, se observan diferencias altamente

significativas ($p=0,000$) en las frecuencias alélicas y genotípicas, que se pueden apreciar cuando se comparan con el grupo control (Figura 18).

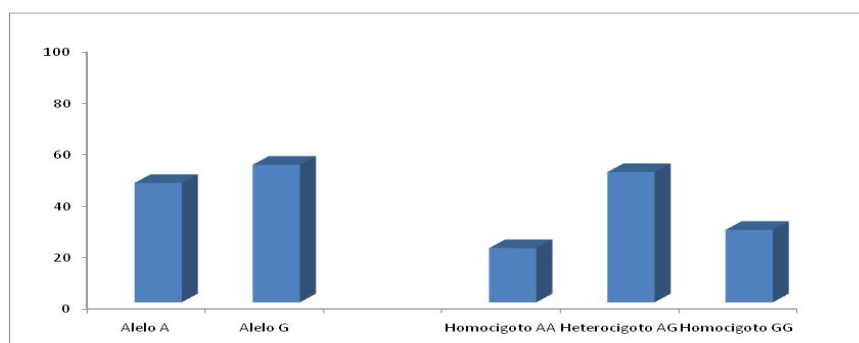


Figura 18.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *CHRNA5* en el grupo de fumadores.

Se ha señalado por distintos autores que los individuos con variaciones específicas en el gen del *CHRNA5*, que participa en la composición de numerosos receptores nicotínicos, parecen tener el doble de posibilidades de ser dependientes de la nicotina²⁰⁶, resultados que coinciden también con los observados en nuestro estudio y con los reportados por otros autores en varios conjuntos de datos independientes^{222,223,229}, señalando también la relación no sólo con el hecho de ser fumador, sino también con determinados rasgos propios de los fumadores como la cantidad de cigarrillos fumados y la intensidad del consumo de cigarrillos (grado grave >20cig/día frente a grado leve <10cig/día)²⁰⁷. La asociación entre el gen *CHRNA5*, rs16969968 (test C__26000428__20), y el consumo de tabaco se ha descrito como la asociación más significativa de todo el genoma en varios meta-análisis actuales^{225,226}.

Los estudios más recientemente publicados y en especial, el metaanálisis de Saccone y cols.²³⁰, vuelven a demostrar que la asociación entre la región rs16969968 y la conducta de fumar es consistente. Encuentran una asociación fuertemente significativa del gen *CHRNA5* no sólo con la región rs16969968, que es la analizada en nuestro estudio, sino también con la región rs1051730 y la rs55853698, asociación que es más intensa en fumadores con un alto grado de tabaquismo.

Los resultados obtenidos con el gen *CHRNA4* son más difíciles de analizar y por ello de discutir. En nuestro estudio las diferencias estadísticas observadas no tienen el mismo grado de significación que las encontradas con los genes *CHRNA3* y *CHRNA5*. En esta caso el alelo C es significativamente más frecuente ($p=0,017$) en fumadores y el T lo es en controles, por lo que podría significar que el hecho de ser portador del alelo C pueda favorecer la dependencia nicotínica.

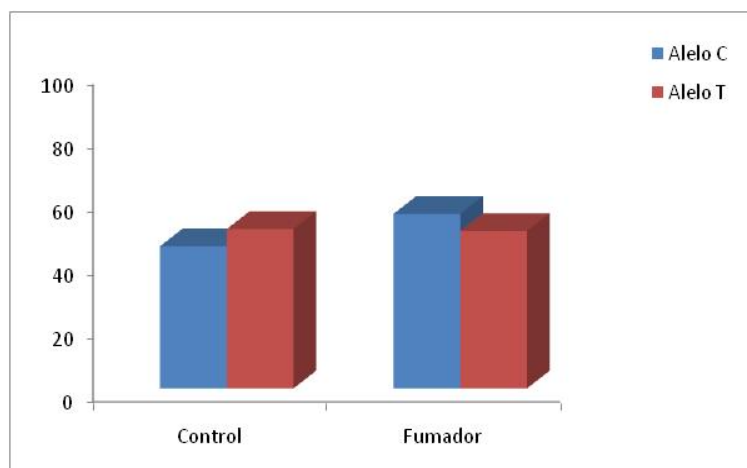


Figura 19.- Porcentajes de las frecuencias alélicas del gen CHRN4 en controles y fumadores.

El genotipo homocigoto CC es más frecuente en el grupo fumadores y el TT lo es en el de controles, aunque esta diferencia no llega a alcanzar significación estadística ($p=0,054$). No obstante, la tendencia observada indica que el hecho de ser portador del genotipo homocigoto CC puede reflejar un factor de riesgo para la dependencia nicotínica, mientras que el genotipo homocigoto TT puede actuar como un factor protector frente al tabaquismo, tal y como se refleja en la tabla 22 del apartado de resultados y de forma gráfica en las figuras 19 a 21.

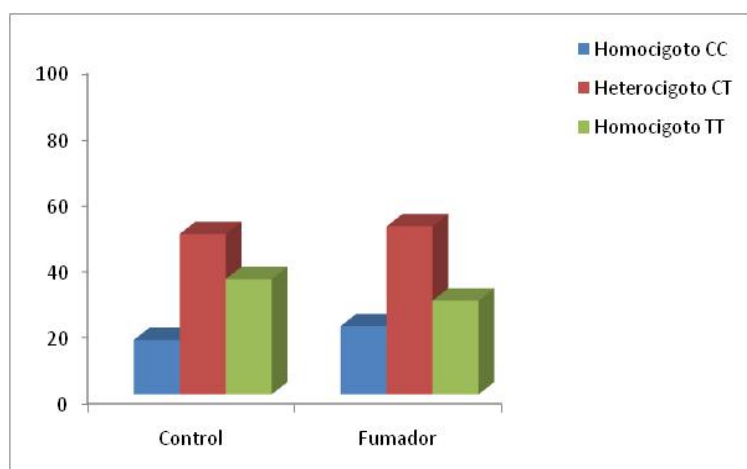


Figura 20.- Porcentajes de las frecuencias genotípicas del gen CHRN4 en controles y fumadores.

Sin embargo, considerando solamente al grupo de los fumadores si se observan diferencias altamente significativas ($p=0,000$) en las frecuencias alélicas y genotípicas, que se pueden apreciar cuando se comparan con el grupo control (Figura 21).

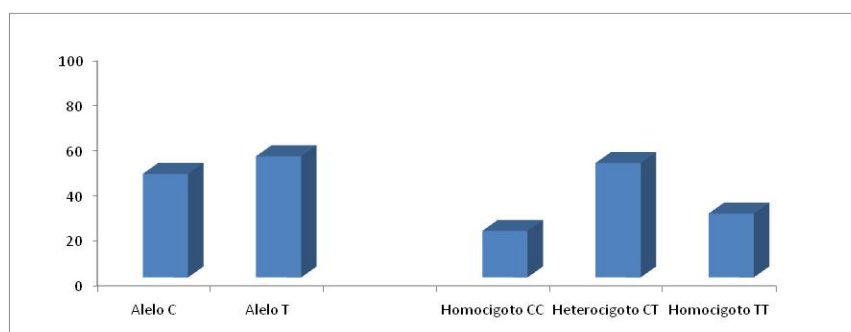


Figura 21.- Porcentajes de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen CHRN4 en fumadores.

Al igual que sucede con la subunidad $\alpha 3$, no existen estudios que traten al gen CHRN4 de forma individual, sino que se refieren a dicho gen en relación al bucle formado con los genes CHRNA3 y CHRNA5 (*CHRNA3A5B4*). Por ejemplo, la variante rs 1948 del gen CHRN4 se encuentra en desequilibrio de ligamento con la región intergénica rs 8023462, y con rs 514743 del gen CHRNA5, y ambas variaciones (el genotipo TT de rs 8023462 y el genotipo CC de rs 1948) se asocian con la edad temprana al consumo de tabaco y de alcohol, y con varios fenotipos de fumadores²⁹¹, confirmando nuestros hallazgos donde se aprecia que el genotipo homocigoto CC del gen CHRN4 puede actuar como factor de riesgo para la dependencia nicotínica siendo más frecuente en el grupo de fumadores, y por tanto, favoreciendo el inicio y mantenimiento del tabaquismo.

4.- Estudio de los genes para las variables de género y edad

4.1.- Género

Como se observa en las tablas 3 y 13 de resultados para los genes CHRNA3 y CHRNA5, y en las figuras 22 y 23 (gráficos A-B y C-D), el alelo A es significativamente más frecuente en varones fumadores que en varones no fumadores, siendo esta asociación en mujeres más débil. En el estudio de los genotipos se observan también diferencias estadísticamente significativas entre controles y fumadores en el grupo de hombres pero no en el de mujeres.

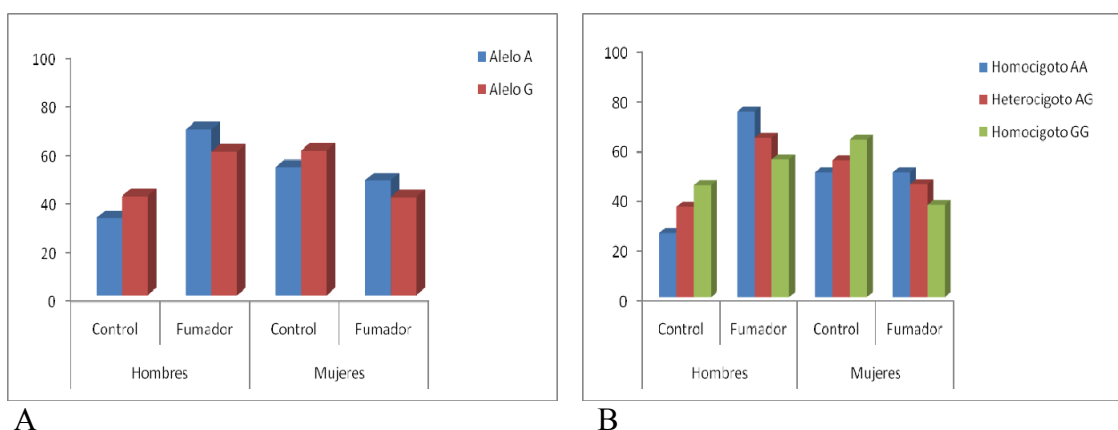


Figura 22 .- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA3 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (A, B).

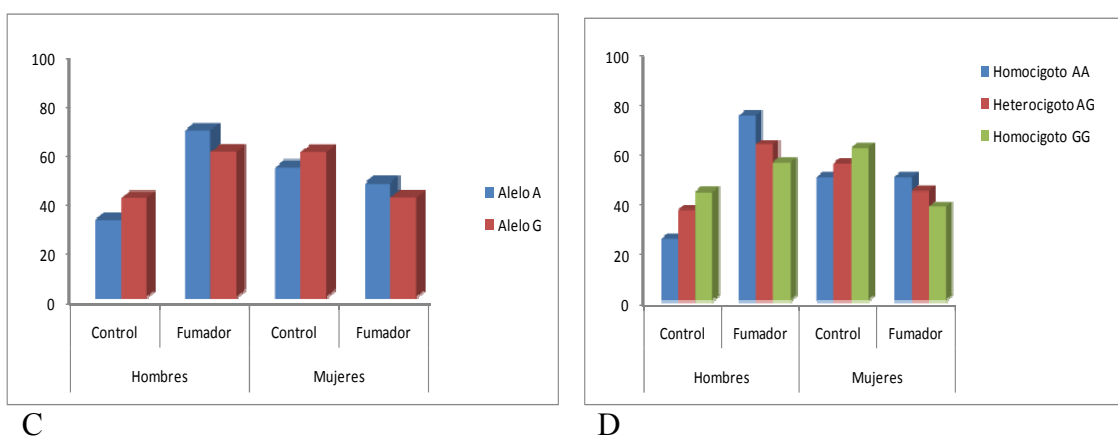


Figura 23.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA5 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (C, D).

Para el gen CHRNA4 el alelo C es significativamente más frecuente en varones fumadores que en varones no fumadores, mientras que en mujeres esta asociación no es estadísticamente significativa. En el estudio de los genotipos, las diferencias entre los porcentajes no son estadísticamente significativas entre controles y fumadores en el grupo de hombres ni en el de las mujeres (tabla 23 de resultados y figura 24).

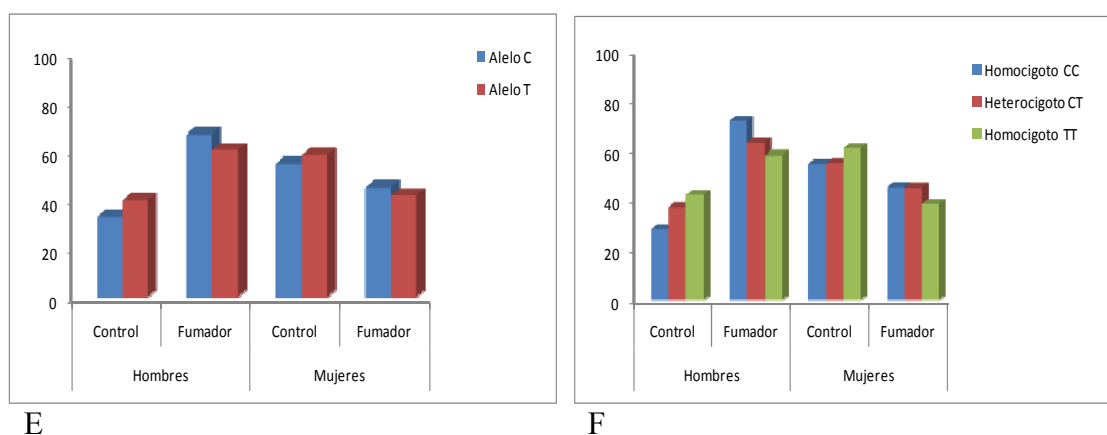


Figura 24.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRNA4 para el grupo control y fumadores para la variable sexo (E,F).

Por lo tanto se deduce que el alelo A y el genotipo homocigoto AA pueden favorecer la dependencia nicotínica más fácilmente en hombres que en mujeres en los genes *CHRNA3A5*. El alelo C del gen *CHRNA4* también puede aumentar la probabilidad de ser fumador en los varones, mientras que el genotipo homocigoto CC parece actuar independientemente del género. Estos hallazgos confirman lo anteriormente publicado sobre la influencia de estos genes y la adicción a la nicotina^{206,207,239,240,241}.

Existen pocos estudios que profundicen sobre las diferencias en los comportamientos y pautas de consumo de tabaco entre mujeres y hombres, y de forma específica, en lo que se refiere a la experimentación e inicio, en su mantenimiento y en su abandono, siendo en algunos casos los resultados contradictorios. La mayoría de estudios se centran en población fumadora masculina, ya que es el porcentaje mayor de fumadores.

Se ha sugerido que las mujeres jóvenes que fuman con regularidad o que lo hicieron en el pasado, presentan un perfil neurocognitivo caracterizado por alteraciones, pequeñas pero significativas, de atención sostenida. Sin embargo, Yakir et al. sugieren que la mejora de la función cognitiva proporcionada por la nicotina en el área de la atención y de la impulsividad, podría predisponer a las mujeres jóvenes con déficits de atención que inician el consumo, a mantener la dependencia nicotínica³⁰⁹. Por otro lado, en un estudio de Rigbi y cols.³¹⁰ se demostró que existía una asociación entre el bajo rendimiento intelectual en la atención selectiva en mujeres fumadoras y varios SNPs de receptores nicotínicos entre los que se encontraba uno de nuestros genes a estudio (*CHRNA5*) y que estas diferencias en la función neurocognitiva entre fumadoras y no fumadoras podría ser modulada por las variantes de los genes de los nAChRs, con posibles consecuencias para la prevención y el tratamiento del tabaquismo.

Por otra parte, aunque estudios previos han señalado la importancia de los antecedentes, de la experiencia de la vida, y de los factores psicológicos en el inicio y mantenimiento de la dependencia nicotínica en mujeres^{15,311,312}, poco se sabe sobre la relación de estos factores y los genes que confieren susceptibilidad a estos fenotipos de fumadoras. La mayoría de estudios sobre el potencial papel de los polimorfismos genéticos se han centrado en los efectos directos de genes candidatos o genes de susceptibilidad para la dependencia nicotínica.

El estudio de Greenbaum y cols.³¹³ realiza un enfoque integrado teniendo en cuenta la contribución independiente de los antecedentes familiares y las características psicológicas y de su interacción con los polimorfismos en una serie de receptores colinérgicos nicotínicos, observando una muy fuerte contribución al inicio del consumo de los factores psicológicos, de la experiencia de la vida, y de la interacción entre la enzima COMT y variaciones de los genes colinérgicos CHRNA3A5.

En un trabajo de Janes y colaboradores³¹⁴, se ha visto que las mujeres dependientes de la nicotina que carecen del alelo de riesgo A de la variante rs 16969968 del gen CHRNA5 y poseen el genotipo homocigoto GG, muestran una mayor reactividad cerebral a imágenes relacionadas con el tabaco, evaluadas por resonancia magnética cerebral funcional (fMRI) en áreas del cerebro relacionadas habitualmente con la memoria y el comportamiento, como el hipocampo y el núcleo estriado dorsal, resultado contradictorio hasta el momento, ya que se esperaría que las fumadoras con expresión del alelo A de la rs 16969968 del gen CHRNA5 tuvieran una mayor reactividad. Esto marca una disociación entre las fumadoras con el alelo de riesgo A para la dependencia nicotínica y la reactividad cerebral a señales relacionadas con el tabaquismo que aparece en fumadores con el alelo G. En parte puede ser debido a que las fumadoras con el alelo A pueden tener afectada la memoria, lo que sugiere que las fumadoras con dicho alelo expresen una señal menor en la resonancia cerebral que las fumadoras con el alelo G. Se ha sugerido que la expresión del alelo de riesgo A reduce la función de los receptores nicotínicos, lo que podría aumentar la susceptibilidad a ser dependientes de la nicotina²²⁹.

Sin embargo, otros autores han sugerido que las fumadoras que expresan el alelo A pueden fumar para mejorar deficiencias cognitivas³¹⁵. Es posible que las diferencias genotípicas, que tienen un impacto en la dependencia nicotínica, en la recompensa, y en la cognición, también pueden influir en otros aspectos relacionados con fenotipos del tabaco tales como la reactividad a las imágenes o señales relacionadas con el tabaquismo (cigarrillos, personas fumando, humo de tabaco, etc.).

Los estudios clínicos y preclínicos indican que la señal de reactividad a imágenes desempeña un papel en la conducta de fumar y en la búsqueda de nicotina^{316,317}. La señal de reactividad ante imágenes, medida por resonancia magnética funcional cerebral, pueden conferir una vulnerabilidad para la recaída en fumadores³¹⁸ y en otras poblaciones dependientes de otros tipos de droga³¹⁹ relacionadas con el tabaquismo, lo cual puede influir también en el riesgo de recaídas en los fumadores que intentan dejar de fumar.

Aunque el alelo G no es un factor de riesgo equivalente para el desarrollo de dependencia a la nicotina, las fumadoras con el genotipo homocigoto GG que desarrollan dependencia, pueden tener una mayor señal de reactividad cerebral, posiblemente en las regiones cerebrales involucradas en el mantenimiento de las asociaciones con señales o imágenes, incluyendo el núcleo estriado dorsal³²⁰, lo que podría explicar la continuidad de su hábito tabáquico.

El trabajo de Janes y colaboradores³¹⁴ tiene algunas limitaciones: se incluyó una muestra relativamente pequeña, y se limita a las mujeres, por lo que aún se desconoce si el efecto del genotipo observado ocurre también en la población fumadora masculina. Además, no se tiene en cuenta el estado hormonal de la mujer y no se ha demostrado si la fase del ciclo menstrual puede invalidar los resultados, ya que sería importante ver cómo los cambios en las hormonas sexuales esteroideas podrían influenciar la conducta de fumar³²¹.

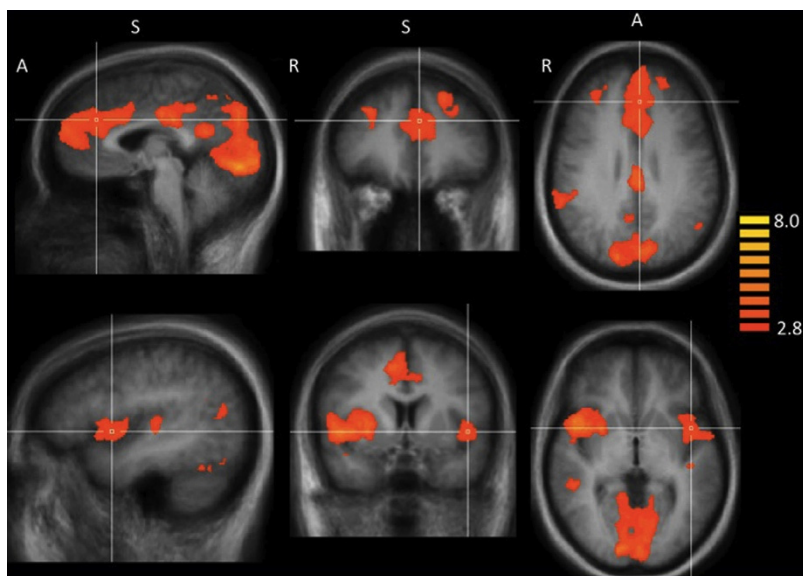


Figura 25.- Análisis de los efectos aleatorios en fumadoras por resonancia magnética cerebral funcional (fMRI). El análisis de todo el cerebro de efectos aleatorios muestra que las fumadoras tienen una mayor reactividad del cerebro medido por fMRI para imágenes relacionadas con el tabaco en relación con las imágenes neutras en varias regiones corticales (incluyendo las estructuras de la línea media y la ínsula) y subcortical en el putamen³¹⁴. Estos patrones de activación se superponen con los resultados de otros estudios^{322,323}. Panel superior muestra la corteza cingulada anterior dorsal en coordenadas de Talairach³²⁴: X=-3, y=34, z=28. A; anterior, S; superior, R; derecho. Panel inferior situado en la corteza ínsular en las coordenadas de Talairach: X=-45, y=5, z=0.

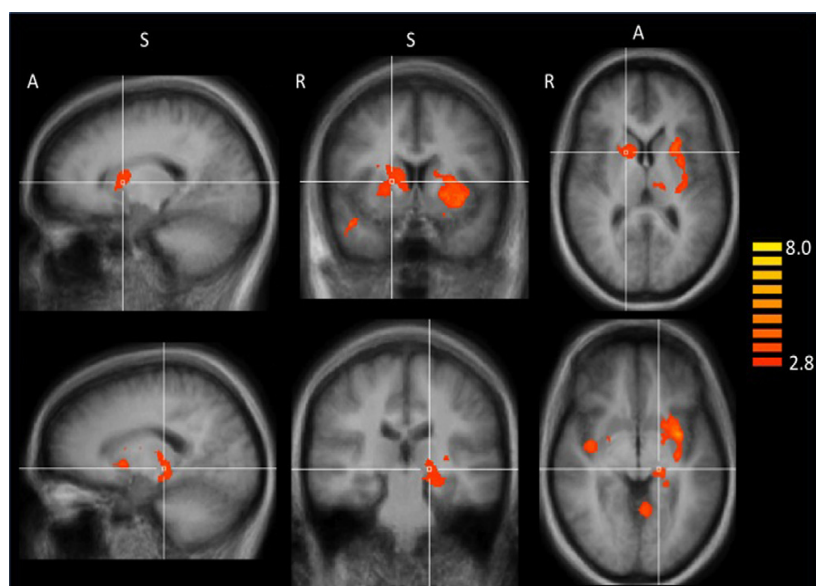


Figura 26 .- Reactividad de las fumadoras homocigotas GG medida por resonancia magnética cerebral funcional (fMRI). Las fumadoras homocigotas GG tienen una mayor reactividad medida por fMRI para imágenes relacionadas con el tabaco frente a imágenes neutras en comparación con las fumadoras del alelo A en varias regiones del cerebro³¹⁴. Panel superior situado en el putamen según las coordenadas de Talairach³²⁴: X=16, y=7, z=8. A; anterior, S; superior, R; derecho. Panel inferior situado en el hipocampo en las coordenadas de Talairach: X=-16, y=-24, z=-3.

Determinar los vínculos entre la genética, la neuroimagen, y una serie de medidas de comportamiento ante el tabaco van a crear una imagen más clara de las interacciones y disociaciones entre los diversos factores de riesgo para la dependencia. Se necesita más investigación para determinar si la variante rs16969968 de CHRNA5 ocasiona vulnerabilidad para la recaída y si los tratamientos en base a la reactividad de la señal pueden ser más eficaces para un genotipo particular, dando opciones a un tratamiento más personalizado.

4.2.- Edad

Como se observa en las tablas 4 y 14 de resultados, y en las figuras 27 y 28 (gráficos G-H e I-J), el alelo A de los genes CHRNA3 y CHRNA5 es significativamente más frecuente en fumadores de los grupos con edad ≤ 40 años y 41 a 60 años, y no alcanza significación estadística en el grupo de mayores de 61 años. Al igual que sucede con los alelos, el análisis de los genotipos en función de la edad muestra diferencias entre controles y fumadores en el gen CHRNA3 en los grupos con edad inferior a 40 años y de 41 a 60 años, pero no en mayores de 60 años, mientras que en CHRNA5 únicamente se observan diferencias significativas en los grupos con edad inferior a 40 años, pero no en el grupo de 41 a 60 años ni en mayores de 60 años.

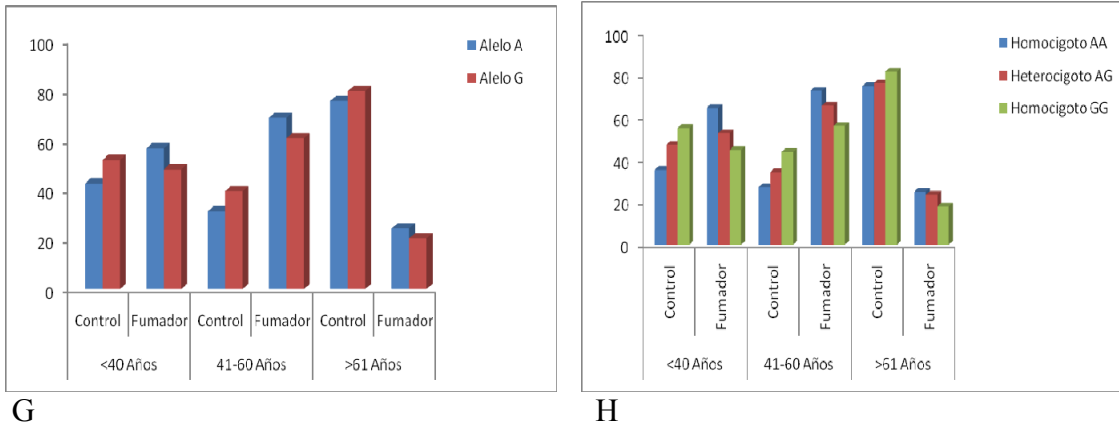


Figura 27 .- Porcentajes de alelos y genotipos del gen *CHRNA3* para el grupo control y fumadores para la variable edad (G, H).

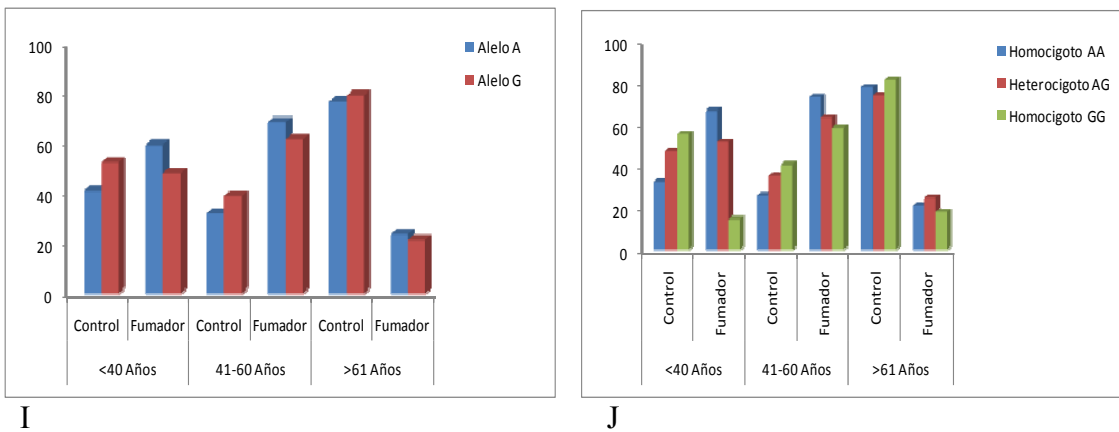


Figura 28.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen *CHRNA5* para el grupo control y fumadores para la variable edad (I, J).

El alelo C del gen *CHRNA4* es más frecuente en fumadores de los grupos con edad ≤ 40 años y 41 a 60 años que en el grupo de edad > 61 años, pero en ningún grupo alcanza significación estadística. Al igual que sucede con los alelos, el análisis de los genotipos en función de la edad, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre controles y fumadores en los grupos de edad, como podemos apreciar en la tabla 24 y en la figura 29 (gráficos K, L).

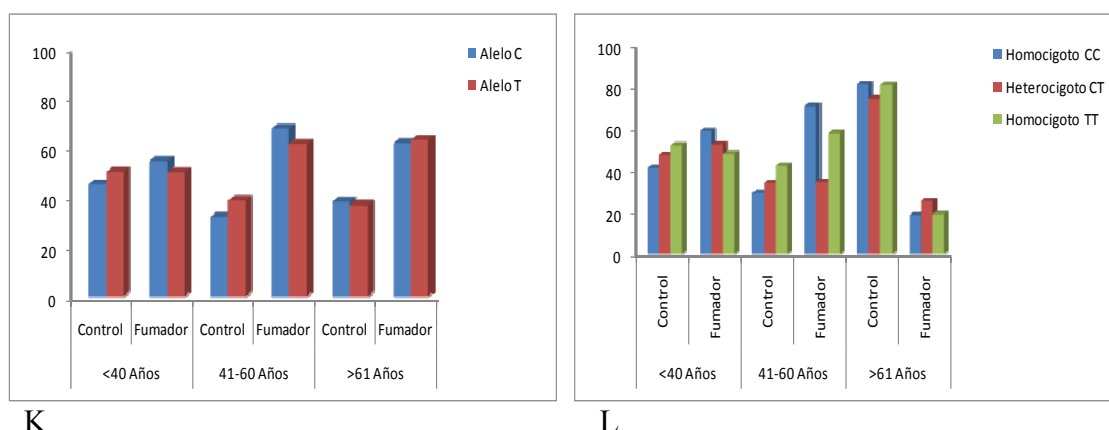


Figura 29.- Porcentajes de alelos y genotipos del gen CHRN4 para el grupo control y fumadores para la variable edad (K, L).

Tanto el alelo A como el genotipo homocigoto AA de los genes CHRNA3A5, podrían actuar como un factor de riesgo para el inicio y mantenimiento del tabaquismo hasta edades medias de la vida, con mayor fuerza cuando se es portador del polimorfismo del gen CHRNA3. Con respecto al gen CHRN4 al estratificar por grupos de edades, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas ni en controles ni en fumadores ni en la distribución de los alelos y genotipos, y por tanto la edad no parece influir en el riesgo de ser dependiente de la nicotina en aquellos sujetos portadores del SNP del gen CHRN4.

Cómo se ha comentado en la introducción, la región rs4950 del receptor CHRN3 se asocia con las primeras respuestas subjetivas al tabaco en adolescentes²³⁴. Así, las intervenciones tempranas en los adolescentes portadores de esta variación podrían evitar que se conviertan en futuros fumadores. Schlaepfer I. y cols.²⁹¹ estudiaron la asociación entre las variaciones genéticas del bucle CHRNA3A5B4 y la iniciación al tabaco, demostrando una posible relación entre dichas variaciones y la edad temprana de experimentación con el tabaco. El grupo liderado por Robert Weiss demostró que existen haplotipos de susceptibilidad y haplotipos protectores en el locus CHRNA3A5B4 asociados con la severidad de la dependencia nicotínica cuando los fumadores empezaron a fumar antes de los 16 años de edad y no se apreció esta asociación en fumadores que habían empezado a fumar después de los 16 años de edad, por lo que se considera que la adolescencia es un período clave en la susceptibilidad a la nicotina, siendo un factor de riesgo muy importante en esta franja de edad el tener un determinado haplotipo para la región génica CHRNA3A5B4²³⁸. La identificación de un haplotipo de susceptibilidad dependiente de la edad refuerza la importancia de la prevención de la exposición temprana al humo de tabaco a través de políticas de Salud Pública, ya que se ha demostrado que el inicio del consumo diario de tabaco en la adolescencia está relacionado con el uso crónico y la dependencia grave de la nicotina en la edad adulta³²⁵⁻³²⁸, una relativa incapacidad para dejar de fumar^{325,329-331}, y una forma más severa de dependencia nicotínica³³²⁻³³⁴.

Un aspecto importante es conocer los grupos de edad donde se observa una mayor prevalencia de los alelos y de los genotipos de riesgo, como población susceptible al tabaquismo para poder actuar preferentemente sobre ellos, impidiendo el inicio al tabaquismo o favoreciendo su abandono una vez iniciado.

En los genes *CHRNA3* y *CHRNA5*, al realizar un análisis de regresión logística se observa que tanto el genotipo heterocigoto AG como el genotipo homocigoto AA se relacionan con la condición de fumador. La presencia de ambos genotipos multiplica las posibilidades de ser fumador. Ello refuerza los resultados ya señalados^{206,207,241} de que ser portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador, ya la presencia del alelo A en *CHRNA3* y *CHRNA5* multiplica las probabilidades de ser fumador y con resultados altamente significativos (Tablas 5 y 15 de resultados).

En la tabla 25 del apartado de resultados, en el análisis de regresión logística del gen *CHRNA4* se observa que tanto el genotipo heterocigoto CT como el genotipo homocigoto CC se relacionan con la condición de fumador, ya que la presencia de estos genotipos multiplican también las probabilidades de ser fumador, aunque únicamente se alcanza la significación estadística ($p < 0,05$) con el genotipo homocigoto CC. De la misma manera, la presencia del alelo C multiplica la probabilidad de ser fumador y con resultados altamente significativos, lo que refuerza los resultados anteriormente señalados donde el alelo C parece ser un factor de riesgo para la dependencia tabáquica²⁹¹.

De nuevo se aprecia que el genotipo homocigoto AA y el alelo A de los genes *CHRNA3A5* pueden influir en el inicio al consumo de tabaco, multiplicando las probabilidades de ser dependientes de la nicotina. El genotipo homocigoto GG y el alelo G de *CHRNA4* también parecen ser factores de riesgo para ser fumador.

El porcentaje mayor de fumadores se encuentra en el grupo de 40 a 60 años, seguido por el grupo de edad \leq a 40 años, existiendo un menor número de fumadores en el grupo mayor de 60 años en los tres genes a estudio. Posiblemente porque los efectos del tabaco sobre la salud son más notorios en edades avanzadas o por el hecho de que los fumadores hayan ido falleciendo como consecuencia de las enfermedades producidas por el tabaco.

4.3.- Modelos de herencia

Una de las primeras observaciones experimentales que resultó discordante con las conclusiones iniciales de Mendel fue la que se refiere a las relaciones entre los dos alelos de un gen. Pronto se hizo patente que no siempre hay un alelo dominante y otro recesivo. Debido a que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado a cada genotipo va a depender del número de copias del alelo de riesgo, el alelo que modifica el riesgo de la enfermedad de interés, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada

codificación de los genotipos. En la actualidad se consideran cuatro tipos de herencia en función de la relación existente entre los alelos de un gen cuya transmisión se estudia: herencia dominante, codominante, recesiva y aditiva. No es fácil hallar un criterio para establecer el modelo de herencia más adecuado para un polimorfismo concreto. Habitualmente, se suele comparar el ajuste del modelo codominante, que es el más general, con los demás modelos.

En las tablas 6 y 16 del apartado de resultados se analizan el modelo de herencia de los genes CHRNA3 y CHRNA5 respectivamente, apreciándose que para ambos, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, siendo prácticamente el doble en el caso del codominante y alcanzando la significación estadística en los tres modelos de herencia (dominante, codominante y recesiva), lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado. Estos descubrimientos nos permiten afirmar que los portadores del alelo A y del genotipo homocigoto AA tienen aumentado el riesgo de ser fumadores, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

En el análisis del riesgo de polimorfismo CHRNB4 en función del modelo de herencia (tabla 26 de resultados) se aprecia que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, alcanzando significación estadística en estos dos modelos de herencia. Al no alcanzarse en los tres modelos de herencia la significación estadística, como ocurría con los otros dos genes, no podemos decir que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado. Al igual que sucede con el alelo A y con el genotipo homocigoto AA en los genes CHRNA3 y CHRNA5, los portadores del alelo C y del genotipo homocigoto CC del gen CHRNB4 tienen aumentado el riesgo de ser fumadores, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

5.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para el género

Al realizar el análisis multivariante, se aprecia que tanto para el gen CHRNA3 como para el CHRNA5 solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o control tanto para el grupo de los hombres como para el grupo de las mujeres, como se aprecia en las tablas 7-8 y 17-18. Ser portador del genotipo homocigoto AA y del genotipo heterocigoto AG multiplica las probabilidades de ser fumador en hombres y en mujeres. A pesar de estos resultados, únicamente en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística en hombres y mujeres. Ello refuerza los resultados anteriormente señalados de que ser portador del genotipo homocigoto AA se relaciona con el hecho de ser fumador, constituyendo un factor de riesgo para la dependencia nicotínica tanto en hombres como en mujeres^{206,207}.

Con respecto al gen CHRNB4 tanto para el grupo de los hombres como para el grupo de las mujeres, solamente el genotipo homocigoto CC aparece

relacionado con la condición de fumador o control, como se aprecia en las tablas 27 y 28. La presencia del genotipo homocigoto CC y heterocigoto CT aumenta las probabilidades de ser fumador en ambos grupos. A pesar de estos resultados, únicamente en el caso del genotipo homocigoto CC se alcanza significación estadística en el grupo de hombres y no en el grupo de mujeres. Ello refuerza los resultados anteriormente señalados de que ser portador del genotipo homocigoto CC se relaciona con el hecho de ser fumador en hombres.

El genotipo homocigoto AA aumenta las probabilidades de ser fumador en hombres y en mujeres, mientras que ser portador del genotipo homocigoto CC constituye en factor de riesgo para la dependencia nicotínica en varones y no en mujeres.

La presencia del alelo A de los genes *CHRNA3A5* multiplica tanto en hombres como en mujeres las probabilidades de ser fumador, mostrando estos resultados altamente significativos para el grupo de los hombres y significativos para el grupo de las mujeres.

El alelo C del gen *CHRNA4*, también multiplica la probabilidad de ser fumador en ambos grupos, mostrando estos resultados significación estadística para el grupo de los hombres y no para el grupo de las mujeres.

Ser portador del alelo A constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica y posiblemente para el abandono de tabaquismo en fumadores sean hombres ó mujeres, mientras que el alelo C se relaciona con el hecho de fumar en varones y no en mujeres.

La predisposición genética a la dependencia nicotínica parece tener un mayor efecto en el grupo de los hombres frente a las mujeres. Esto en parte puede ayudarnos a entender la mayor cifra de fumadores varones frente a mujeres fumadores que existe en la actualidad (32,5% varones frente al 22,2% mujeres, ENS 2009)³³⁵.

Al analizar los modelos de herencia, se aprecia que para *CHRNA3* y para *CHRNA5* (tablas 9 y 19) en el grupo de los hombres tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen aumentado de ser fumadores. En los tres modelos de herencia (dominante, codominante y recesiva) se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia sería el adecuado.

Al igual que sucede con el grupo de hombres, para el grupo de las mujeres, tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, aunque únicamente se alcanza significación estadística en los modelos codominante y dominante en *CHRNA3*, y en el modelo codominante en *CHRNA5*. La herencia parece jugar un papel importante en el caso de fumador varón, con mayor predisposición a ser dependiente de la nicotina que la mujer.

En el análisis del riesgo de polimorfismo del gen CHRN4 en función del modelo de herencia (tabla 29) en el grupo de los hombres y en el grupo de mujeres, se observa que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, alcanzando únicamente la significación estadística en el modelo codominante en el caso de los hombres, y en ninguno de los modelos en el caso de las mujeres, por lo que no podemos sugerir que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado. La herencia en este gen parecen tener un efecto más débil sobre la adicción nicotínica que los otros dos genes estudiados.

6.- Análisis multivariante del riesgo de tabaquismo asociado al alelo y a los genotipos para la edad

Como se puede apreciar en las tablas 10 y 20, al realizar un análisis de regresión logística, para los genes CHRNA3A5, solamente el genotipo homocigoto AA aparece relacionado con la condición de fumador o de control para los individuos con edad ≤ 40 años y con los de edades comprendidas entre 41 y 60 años.

La presencia del genotipo homocigoto AA y del heterocigoto AG multiplican respectivamente las probabilidades de ser fumador para los individuos de edad ≤ 40 años y para los individuos con edades comprendidas entre los 41 años y 60 años, aunque solo en el caso del genotipo homocigoto AA se alcanza significación estadística para los grupos de edad ≤ 40 años y entre 41 años y 60 años en CHRNA3, mientras que en CHRNA5 únicamente se alcanza significación estadística el caso del genotipo homocigoto AA en el grupo de edad < 40 años.

En ambos genes CHRNA3A5, la presencia del alelo A multiplica en todos los grupos de edades las probabilidades de ser fumador. Para CHRNA3, los resultados muestran significación estadística muy elevada para el grupo de edad ≤ 40 años y significativa para el grupo entre 41 años y 60 años, mientras que para CHRNA5 los resultados no muestran significación estadística. Para los individuos mayores de 60 años, los resultados no son estadísticamente significativos. Ello refuerza los resultados señalados a lo largo de la discusión, de que se portador del alelo A se relaciona con el hecho de ser fumador hasta edades medias de la vida^{325-328,332-334}.

El inicio temprano a la dependencia nicotínica se puede dar con mayor probabilidad en individuos que sean portadores del genotipo homocigoto AA tanto en CHRNA3 como en CHRNA5. La dependencia nicotínica tiene mayor fuerza de asociación en aquellos individuos portadores del alelo A del gen CHRNA3 constituyendo un factor de riesgo para la dependencia nicotínica en individuos con edades hasta 60 años, mientras que en CHRNA5 el alelo A actúa independientemente de la edad.

Ni el alelo A ni el genotipo homocigoto AA parecen influir en individuos fumadores mayores de 60 años.

En el análisis de regresión logística del gen CHRN4, considerando al alelo más frecuente -el alelo T- como referencia, solamente el genotipo

homocigoto CC aparece relacionado con la condición de fumador o de control, como se refleja en la tabla 30.

La presencia del genotipo homocigoto CC y del heterocigoto CT multiplican las probabilidades de ser fumador en todos los grupos de edades, sin alcanzar significación estadística en ninguno de ellos. El alelo C también aumenta las probabilidades de ser fumador en todas las edades, pero no muestran significación estadística en ninguno de los grupos.

Los portadores del Alelo C o del genotipo homocigoto CC aumentan las probabilidades de ser fumadores y ello sucede independientemente de la edad.

Mientras que en los genes *CHRNA3A5* la edad se ve afectada por el genotipo homocigoto AA, en *CHRNA4* la edad no parece influir en la dependencia tabáquica. Ningún alelo ni genotipo de los tres genes objeto de estudio constituye un factor de riesgo para la dependencia nicotínica en individuos mayores de 60 años.

Como se puede apreciar en las tablas 11 y 21 donde se analizan los modelos de herencia, para los tres grupos de edades (≤ 40 años, 41-60 años y >60 años) tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos AA de los genes *CHRNA3A5*, tienen un riesgo aumentado de ser fumadores. En el grupo de edad ≤ 40 años en los tres modelos de herencia se alcanza la significación estadística, lo que sugiere que el modelo aditivo de herencia es el adecuado. Sin embargo, en individuos con edades entre los 41 y 60 años y en >60 años no se alcanza significación estadística para ninguno de los tres modelos ($p > 0,05$).

De los tres grupos de edad, el de >60 años es el que tiene los riesgos más bajos. En este grupo existe un menor número de fumadores, bien porque muchos hayan conseguido dejar de serlo, porque se hayan producido fallecimientos como consecuencia del tabaco o porque la influencia genética a estas edades sea prácticamente nula.

En el estudio de los modelos de herencia para los tres grupos de edad del gen *CHRNA4* (tabla 31) los individuos con edad ≤ 40 y con edades comprendidas entre los 41 y 60 años tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos homocigotos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores, mientras que para los individuos con edad igual a superior a los 61 años tan sólo para el modelo dominante los individuos CC tienen un riesgo aumentado de ser fumadores. En ninguno de los tres modelos de herencia y en ninguno de los grupos de edades se alcanza la significación estadística, no pudiendo afirmar que el modelo aditivo de herencia sea el adecuado.

En el grupo de edad ≤ 40 años la herencia parece jugar un papel importante en los genes *CHRNA3A5*, aunque en individuos con edades entre los 41 y 60 años y en >60 años el papel de la herencia es más débil. En *CHRNA4* la herencia no juega un papel importante en la transmisión de factores de riesgo según los grupos de edad.

Se ha visto que las personas que empiezan a fumar a edad temprana tienen un mayor riesgo de adicción a la nicotina a largo plazo²³⁸. La asociación entre las variantes genéticas de los receptores nicotínicos y la dependencia nicotínica será más fuerte entre los fumadores que comenzaron a fumar en la adolescencia, antes de los 16 años. La investigación humana y animal muestra que fumar tempranamente versus tardíamente o que la exposición temprana a la nicotina se asocia con dependencia más grave, o con una mayor auto-administración de nicotina, que se manifiesta en la edad adulta³³⁶⁻³³⁸, y que la adolescencia es un período de sensibilidad a la recompensa de la nicotina, así como de insensibilidad a las acciones aversivas de la misma^{339,340}.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- El alelo G y el genotipo homocigoto GG de los genes CHRNA3 y CHRNA5 son significativamente más frecuentes en controles que en fumadores.

2.- El alelo A y el genotipo homocigoto AA de los genes CHRNA3 y CHRNA5 son significativamente más frecuentes en fumadores que en controles. A su vez son más frecuentes en fumadores varones que en mujeres.

3.- El alelo T y el genotipo homocigoto TT del gen CHRNB4 son significativamente más frecuentes en controles que en fumadores.

4.- El alelo C y el genotipo homocigoto CC del gen CHRNB4 son significativamente más frecuentes en fumadores que en controles. El genotipo homocigoto CC actúa independientemente del género.

5.- El alelo A y el genotipo homocigoto AA de los genes CHRNA3A5 constituyen un factor de riesgo para el inicio y el mantenimiento del tabaquismo hasta edades medias de la vida, mientras que el alelo C y el genotipo homocigoto CC parecen actuar independientemente de la edad.

6.- Estas conclusiones permiten avanzar la hipótesis de que el genotipo homocigoto GG de los genes CHRNA3A5 y el genotipo homocigoto TT del gen CHRNB4 pueden actuar como un factor protector frente al tabaquismo, mientras que el hecho de portar el genotipo homocigoto AA o el genotipo homocigoto CC constituye un factor de riesgo para el inicio al consumo y posiblemente dificulta el abandono del tabaco en los fumadores.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher L, Kaij L, Denker S, Jonson E. Smoking habits of monozygotic twins. *Br Med J*. 1958;1:1090-5.
2. Risch N. The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(7):733-41.
3. Lichtenstein P, Holm N, Verkasalo P, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine*. 2000;343(2):78-85.
4. Humphries S, Talmud P, Hawe E, Bolla M, Day I, Miller G. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study. *Lancet*. 2001;358(9276):115-9.
5. Lomas DA, Silverman EK. The genetic of chronic obstructive pulmonary Disease. *Respir Res*. 2001;2:20-6.
6. Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. 1996;16:905-8.
7. Fisher R. Cancer and smoking. *Nature*. 1958;182:596.
8. Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz RR. Heritability of substance use in the NAS-NRC Twin Registry. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1990;39:91-8.
9. Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz RR. Genetic influence on smoking: a study of male twins. *The New England journal of medicine*. 1992;327:829-33.
10. Eaves L, Eysenck HJ. New approaches to the analysis of twin data and their application to smoking behavior. *The causes and effects of smoking*, in Eysenck H.J.(ed). London, UK 1980.
11. Edwards K, Austin MA, Jarvik GP. Evidence for genetic influences on smoking in adult women twins. *Clin Genet*. 1995;47:236-44.
12. Hannah M, Hopper JL, Mathews JD. Twin concordance for a binary trait: II; Nested analysis of ever-smoking and ex-smoking traits and unnested analysis of a "committed-smoking" trait. *Am J Hum Genet*. 1985;37:153-65.
13. Heath A, Martin NG. Genetic models for the natural history of smoking: evidence for a genetic influence on smoking persistence. *Addict Behav*. 1993;18:19-34.
14. Kaprio J, Hammer N, Koskenvuo M, Floderus-Myrhed B, Langinvainio H, Sarna S. Cigarette smoking and alcohol use in Finland and Sweden: a cross-national twin study. *Int J Epidemiol*. 1982;11:378-86.

15. Kendler KS, Neale MC, Sullivan P, Corey LA, Gardner CO, Prescott CA. A population-based twin study in women of smoking initiation and nicotine dependence. *Psychol Med.* 1999;29:299-308.
16. Raaschou-Nielsen E. Smoking habits in twins. *Dan Med Bull.* 1960;7:82-8.
17. Sullivan PF, Kendler KS. The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res.* 1999;1:51-7.
18. Todd G, Mason JI. Concordance of smoking habits in monozygotic and dizygotic twins *Hereditary.* 1859;13:417- 44.
19. True WR, Heath AC, Scherrer JF, Waterman B, Goldberg J, Lin N, et al. Genetic and environmental contributions to smoking. *Addiction.* 1997;92:1277-87.
20. Williams JS, Crumpacker DW, Krier M. Genetic and environmental variance fractions and correlation estimates for smoking behavior in a Swedish population. *Twin research 3: Part C; epidemiology and clinical studies* (M Gedda, L Parisi, P Nance, WE eds.). 1981;53-9.
21. Kendler K, Thornton LM, Pederson NL. Tobacco consumption in Swedish twins reared apart and reared together. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;57:886-92.
22. Eaves L, Eysenck HJ. The genetic of smoking. The causes and effects of smoking, in Eysenk H.J.(ed). Londres: Temple - Smith 1980.
23. Osler M, Holst C, Prescott E, Sorensen TI. Influence of genes and family environment on adult smoking behavior assessed in an adoption study. *Genetic epidemiology.* 2001 Nov;21(3):193-200.
24. Lerman C, Berrettini W. Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence. *American Journal of Medical Genetics.* 2003;118B:48-54.
25. Madden PA, Heath AC. The genetics of smoking persistence in men and women: a multicultural study. *Behavior genetics.* 1999 Nov;29(6):423-31.
26. Hong Xian, Jeffrey FS, Pamela AF, Michael JL, Ming T, William RT, et al. The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit *Nicotine Tob Res.* 2003;5(2):245-54.
27. Madden PA, Bucholz KK, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DJ, et al. Nicotine withdrawal in women. *Addiction.* 1997 Jul;92(7):889-902.
28. Austin MA , King MC , Bawol RD , Hulley SB , Friedman GD. Risk factors for coronary heart disease in adult female twins: genetic heritability and shared environmental influences. *Am J Epidemiol.* 1987;125:308-18.
29. Fabsitz, Garrison RJ, Feinleib M, Hjortland M. A twin analysis of dietary intake: evidence for a need to control for possible environmental differences in monozygotic and dizygotic twins. *Behavior genetics.* 1978;8:15-25.
30. Morrison C, Lee PN. A comparison of the effects of nicotine and physostigmine on a measure of activity in the rat. *Psychopharmacologia.* 1968;13:210-21.

31. Hatchell P, Collins AC. The influence of genotype and sex on behavioral sensitivity to nicotine in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1980;71:45-9.
32. Robinson S, Marks MJ, Collins AC. Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996;124:332-9.
33. Marks M, Collins AC. Characterization of nicotine binding in mouse brain and comparison with the binding of α -bungarotoxin and quinuclidinyl benzilate. *Mol Pharmacol*. 1982;22:554-64.
34. Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 1998;391:173-7.
35. Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, et al. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α -bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci*. 1997;17:9165-71.
36. Nabeshima T, Itoh A, Kobayashi K, Morita S, Mizuguchi T, Sawada H, et al. Effects of subacute administration of methamphetamine and nicotine on locomotor activity in transgenic mice expressing the human tyrosine hydroxylase gene. *J Neural Transm Gen Sect*. 1994;97:41-9.
37. Hiremagalur B, Nankova B, Nitahara J, Zeman R, Sabban EL. J Nicotine increases expression of tyrosine hydroxylase gene: involvement of protein kinase A-mediated pathway. *Biol Chem*. 1993;268:23704-11.
38. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
39. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et-al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-51.
40. Walton R, Johnstone E, Munafó M, Neville M, Griffiths S. Genetic clues to the molecular basis of tobacco addiction and progress towards personalized therapy. *Trends Mol Med*. 2001;7:70-6.
41. Bergen AW, Korczak JF, Weissbecker KA, Goldstein AM. A genome-wide search for loci contributing to smoking and alcoholism. *Genet Epidemiol* 1999;17(Suppl 1):55-60.
42. Duggirala R, Almasy L, Blangero J. Smoking behavior is under the influence of a major quantitative trait locus on human chromosome 5q. *Genet Epidemiol*. 1999;17(Suppl 1):139-44.
43. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, et al. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1996 Nov;24(11):1212-7.
44. Tyndale RF, Sellers EM. Genetic variation in CYP2A6 - mediated nicotine metabolism alters smoking behavior. *Ther Drug Monit*. 2002;24:163-71.

45. Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest*. 2003;23:1730-9.
46. Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, Shimada T. Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine Oxidation by human liver microsomes. *Archives of Toxicology*. 1999;73:65-70.
47. Pearce R, Greenway D, Parkinson A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;298:211-25.
48. Hoffman SM, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Mohrenweiser HW. Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *Mol Evol*. 1995;41:894-900.
49. Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature*. 1998;393:750.
50. Rao Y, Hoffmann E, Zia M, Bodin L, Zeman M, Sellers EM, et al. Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. *Mol Pharmacol*. 2000;58:747-55.
51. Tyndale RF, Sellers EM. Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29:548-52.
52. Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997;282:1608-14.
53. Alvan G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol*. 1990;39:533-7.
54. Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM. Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*. 1996;6:319-28.
55. Lovlie R, Daly K, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*. 1996;392:30-4.
56. Turgeon J, Labbe L, Lefez C, et al. Debrisoquine metabolic ratio distribution differs between smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther*. 1995;57:150.
57. Cholerton S, Boustead C, Taber H, Arpanahi A, Idle JR. CYP2D6 genotypes in cigarette smokers and non-tobacco users. *Pharmacogenetics*. 1996;6:261-3.
58. Boustead C, Taber H, Idle JR, Cholerton S. CYP2D6 genotype and smoking behaviour in cigarette smokers. *Pharmacogenetics*. 1997;7:411-4.

59. Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Impivaara O, et al. CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behaviour. *Pharmacogenetics*. 2000;10:5-10.
60. Laforest L, Wikman H, Benhamou S, Saarikoski ST, Bouchardy C, Hirvonen A, et al. CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer susceptibility and phenotype-genotype relationships. *Eur J Cancer*. 2000;36:1825-32.
61. London SJ, Daly AK, Leathart JB, Navidi WC, Carpenter CC, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African- Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Carcinogenesis*. 1997;18:1203-14.
62. Agundez JA, Gallardo L, Ledesma MC, Lozano L, Rodriguez-Lescure A, Pontes JC, et al. Functionally active duplications of the CYP2D6 gene are more prevalent among larynx and lung cancer patients. *Oncology* 2001;61:59-63.
63. Bouchardy C, Benhamou S, Dayer P. The effect of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res*. 1996;56:251-3.
64. Tefre T, Daly AK, Armstrong M, Leathart JB, Idle JR, Brogger A, et al. Genotyping of the CYP2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and controls. *Pharmacogenetics*. 1994;4:47-57.
65. Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Hawk LH, Pinto. A, et al. Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics*. 2002;12(8):627-34.
66. Miksys S, Lerman C, Shields PG, Mash DC, Tyndale RF. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology*. 2003;45:122-32.
67. Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*. 1996;382:255-7.
68. Camí J, Farré M. *Drug Addiction*. The New England journal of medicine. 2003;349(10):975-86.
69. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997;278:58-63.
70. Alfonso Díez A. Estudio de la correlación genotipo-fenotipo en individuos con hábito tabáquico (Tesis Doctoral). Salamanca: Facultad de Medicina Universidad de Salamanca; 2004.
71. Nisell M, Nomikos GG, Svensson TH. Nicotine dependence, mid-brain dopamine systems and psychiatric disorders. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76:157-62.
72. Salokangas RK, Viikman H, Ilonen T, Taiminen T, Bergman J, Haaparanta M, et al. High levels of dopamine activity in the basal ganglia of cigarette smokers. *Am J Psychiatry*. 2000;157:632-4.
73. Seeman P, Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15(7):264-70.

74. Wong AH, Buckle CE, Van Tol HH. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *European Journal of Pharmacology*. 2000;410:183-203.
75. Cichon S, Hothenn MM, Erdmann J, Propping P. Detection of four polymorphic sites in the human dopamine D1 receptor gene (DRD1). *Hum Mol Genet*. 1994;3:209.
76. Comings DE, Gade R, Wu S, Chiu C, Dietz G, Muhleman D, et al. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. *Mol Psychiatry*. 1997;2(1):44-56.
77. Huang W, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Dupont RT, Li MD. Significant association of DRD1 with nicotine dependence. *Hum Genet*. 2008;123:133-40.
78. Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA*. 1990;263:2055-60.
79. Noble EP, Blum K, Ritchie T, Montgomery A, Sheridan PJ. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Archives of General Psychiatry*. 1991;48:648-54.
80. Smith SS, O'Hara BF, Persico AM, Gorelick DA, Newlin DB, Vlahov D, et al. Genetic vulnerability to drug abuse. The D2 dopamine receptor Taq I B1 restriction fragment length polymorphism appears more frequently in polysubstance abusers. *Archives of General Psychiatry*. 1992;49:723-7.
81. Spitz MR, Shi H, Yang F, Hudmon KS, Jiang H, Chamberlain RM et al. Case-control study of the D2 dopamine receptor gene and smoking status in lung cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90:358-63.
82. Gelernter J, Southwick S, Goodson S, Morgan A, Nagy L, Charney DS. No association between D2 dopamine receptor (DRD2) "A" system alleles, or DRD2 haplotypes, and posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*. 1999;45:620-5.
83. Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, et al. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet*. 1989;45(5):778-85.
84. Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, et al. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. 1999;4:290-6.
85. Noble EP, St Jeor ST, Ritchie T, Syndulko K, St Jeor SC, Fitch RJ, et al. D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Med Hypotheses*. 1994;42:257-60.
86. Comings DE, Ferry L, Bradshaw-Robinson S, Burchette R, Chiu C, Muhleman D. The dopamine D2 receptor (DRD2) gene: a genetic risk factor in smoking. *Pharmacogenetics*. 1996;6:73-9.
87. Wu X, Hudmon KS, Detry MA, Chamberlain RM, Spitz MR. D2 dopamine receptor gene polymorphisms among African-Americans and Mexican-

- Americans: a lung cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1021-6.
88. Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggot M, Lloyd S, Perry EK, et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics.* 1997;7:479-84.
 89. Bierut LJ, Rice JP, Edenberg HJ. Family-based study of the association of the dopamine D2 receptor gene (DRD2) with habitual smoking. *Am J Med Genet.* 2000;90:299-302.
 90. Yoshida K, Hamajima N, Kozaki Ki, Saito H, Maeno K, Sugiura T, et al. Association between the dopamine D2 receptor A2/A2 genotype and smoking behavior in the Japanese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:403-5.
 91. Singleton AB, Thomson JH, Morris CM, Court JA, Lloyd S, Cholerston S. Lack of association between the dopamine D2 receptor gene allele DRD2* A1 and cigarette smoking in a United Kingdom population. *Pharmacogenetics.* 1998;8:125-8.
 92. Shields PG, Lerman C, Audrain J, Bowman ED, Main D, Boyd NR et al. Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:453-8.
 93. Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat Genet.* 1996;12:81-4.
 94. Svingos AL, Periasamy S, Pickel VM. Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse.* 2000;36:222-32.
 95. Feldpausch DL, Needham LM, Stone MP, Althaus JS, Yamamoto BK, Svensson KA, et al. The role of dopamine D4 receptor in the induction of behavioral sensitization to amphetamine and accompanying biochemical and molecular adaptations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1998;286:497-508.
 96. Giros B, Caron MG. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14(2):43-9.
 97. Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW et al. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics.* 1992;14:1104-6.
 98. Kang AM, Palmatier MA, Kidd KK. Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biological Psychiatry.* 1999;46:151-60.
 99. Vandenberg DJ, Kozlowski LT, Bennett CJ, Grant MD, Strasser AA, O'Connor R, et al. DAT's not all, but it may be more than we realize. *Nicotine & Tobacco Research.* 2002;4:251-2.

100. Jacobsen LK, Staley JK, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Innis RB, et al. Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: a preliminary report. *American Journal of Psychiatry*. 2000;157:1700-3.
101. Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, et al. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22:133-9.
102. Lerman C, Caporaso NE, Audrain J, Main D, Bowman ED, Lockshin B, et al. Evidence suggesting the role of specific genetic factors in cigarette smoking. *Health Psychol*. 1999;18:14-20.
103. J Jorm AF, Henderson AS, Jacomb PA, Christensen H, Korten AE, Rodgers B, et al. Association of smoking and personality with a polymorphism of the dopamine transporter gene: results from a community survey. *Am J Med Genet*. 2000;96:331-4.
104. Sabol SZ, Nelson ML, Fisher C, Gunzerath L, Brody CL, Hu S, et al. A genetic association for cigarette smoking behavior. *Health Psychol*. 1999;18:7-13.
105. Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, et al. Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet*. 1995;56:993-8.
106. Arinami T, Ishiguro H, Onaivi E. Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. *Eur J Pharmacol*. 2000;410:215-26.
107. Geijer T, Jonsson E, Neiman J, Persson ML, Brene S, Gyllander A, et al. Tyrosine hydroxylase and dopamine D4 receptor allelic distribution in Scandinavian chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21:35-9.
108. Thibaut F, Ribeyre JM, Dourmap N, Meloni R, Laurent C, Campion D, et al. Association of DNA polymorphism in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene with disturbances of the catecholaminergic system in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1997;23:259-64.
109. Todd RD, Lobos EA, Parsian A, Simpson S, DePaulo JR. Manic-depressive illness and tyrosine hydroxylase markers: Bipolar Disorder Working Group. *Lancet*. 1996;347:1634.
110. Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, Shea C, et al. Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:14065-9.
111. Fowler JS, Volkow ND, Wang G-J, Pappas N, Logan J, MacGregor R, et al. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature*. 1996;379:733-6.
112. McKinney EF, Walton RT, Yudkin P, Fuller A, Haldar NA, Mant D, et al. Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. *Pharmacogenetics*. 2000;10:483-91.
113. Costa-Mallen P, Costa LG, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. Genetic polymorphism of dopamine D2 receptors in Parkinson's

- disease and interactions with cigarette smoking and MAO-B intron 13 polymorphism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;69:535-7.
114. Lerman C, Shields PG, Main D, Audrain J, Roth J, Boyd NR, et al. Lack of association of tyrosine hydroxylase genetic polymorphism with cigarette smoking. *Pharmacogenetics*. 1997;7:521-4.
 115. Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res*. 1993;621:311-8.
 116. Awtry TL, Werling LL. Acute and chronic effects of nicotine on serotonin uptake in prefrontal cortex and hippocampus of rats. *Synapse*. 2003;50:206-11.
 117. Nielsen DA, Jenkins GL, Stefanisko KM, Jefferson KK, Goldman D. Sequence, splice site and population frequency distribution analyses of the polymorphic human tryptophan hydroxylase intron 7. *Molecular Brain Research*. 1997;45:145-8.
 118. Manuck SB, Flory JD, Ferrell RE, Dent KM, Mann JJ, Muldoon MF. Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene. *Biological Psychiatry*. 1999;45:603-14.
 119. Sullivan PF, Jiang Y, Neale MC, Kendler KS, Straub RE. Association of the tryptophan hydroxylase gene with smoking initiation but not progression to nicotine dependence. *American Journal of Medical Genetics*. 2001;105:479-84.
 120. Lerman C, Caporaso NE, Bush A, Zheng YL, Audrain J, Main D, Shields PG. Tryptophan hydroxylase gene variant and smoking behavior. *American Journal of Medical Genetics*. 2001;105:518-20.
 121. Lerman C, Shields PG, Audrain J, Main D, Cobb B, Boyd NR, et al. The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7:253-5.
 122. Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin Y, et al. Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking among Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8:831-3.
 123. Lerman C, Caporaso NE, Audrain J, Main D, Boyd NR, Shields PG. Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoking practices and nicotine dependence. *Mol Psychiatry*. 2000;5:189-92.
 124. Hu S, Brody CL, Fisher C, Gunzerath L, Nelson ML, Sabol SZ, et al. Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Mol Psychiatry*. 2000;5:181-8.
 125. Gerra G, Garofano L, Zaimovic A, Moi G, Branchi B, Bussandri M, et al. Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents. *Am J Med Genet*. 2005;135B:73-8.
 126. Kremer I, Bachner-Melman R, Reshef A, Broude L, Nemanov L, Gritsenko I, et al. Association of the serotonin transporter gene with smoking behavior. *Am J Psychiatry*. 2005;162:924-30.

127. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, et al. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect.* 1994;95:157-62.
128. Fagerström KO, Balfour D. Neuropharmacology and potential efficacy of new treatments for tobacco dependence. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006;15:107-16.
129. Chiamulara C. Neurological pathways implicated in addiction: the noradrenergic pathways. 9th Annual Conference of the SRNT Europe Madrid Libro de proceedings. 2007:7-8.
130. Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BLC. Response of nicotine self-administration to manipulations of mu-opioid and GABA receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology.* 2000;149(2):107-14.
131. Sullivan MA, Covey LS. Nicotine dependence: the role for antidepressants and anxiolytics. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002;3(2):262-71.
132. Magata Y, Kitano H, Shiozaki T, Iida Y, Nishizawa S, Saji H, Konishi J et al. Effect of chronic (-)-nicotine treatment on rat cerebral benzodiazepine receptors. *Nucl Med Biol.* 2000;27:163-8.
133. Paterson NE, Froestil W, Markou A. The GABA (B) receptor agonist baclofen and CGCP44532 decreased nicotine self-administration in the rat. *Psychopharmacology.* 2004;172:179-86.
134. Li MD, Cheng R, Ma JZ, Swan GE. A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction.* 2003;98(1):23-31.
135. Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Dupont RT, Crews KM, Somes G, et al. Single- and multilocus allelic variants with the GABA(B) receptor subunit 2 (GABAB2) gene are significantly associated with nicotine dependence. *Am J Hum Genet.* 2005;76:859-64.
136. Flatscher-Bader T, Zuvella N, Landis N, Wilce PA. Smoking and alcoholism target genes associated with plasticity and glutamate transmission in the human ventral tegmental area. *Hum Molec Genet.* 2008;17:38-51.
137. Hutcheson DM, Matthes HW, Valjent E, Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Diaz M, Garzon J, et al. Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *European Journal of Neuroscience.* 2001;13:153-61.
138. Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. *Human Mutation.* 2002;19:459-60.
139. Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *Journal of Neuroscience.* 2002;22:1146-54.

140. Roberts AJ, McDonald JS, Heyser CJ, Kieffer BL, Matthes HW, Koob GF, Gold LH. Mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;293:1002-8.
141. Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:10935-40.
142. Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*. 2002;7:224-8.
143. Almeida LE, Pereira EF, Alkondon M, Fawcett WP, Randall WR, Albuquerque EX. The opioid antagonist naltrexone inhibits activity and alters expression of alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors in hippocampal neurons: implications for smoking cessation programs. *Neuropharmacology*. 2000;39(13):2740-55.
144. Ismail Z, El-Guebaly N. Nicotine and endogenous opioids: toward specific pharmacotherapy. *Can J Psychiatry*. 1998;43:37-42.
145. DiMarco V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998;21:521-28.
146. Castane A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology*. 2002;43:857-67.
147. Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrié P. SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behavioural Pharmacology*. 2002;13(5-6):451-63.
148. Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R. Behavioral and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. *Br Journal of pharmacology*. 2002;135:564-78.
149. González S, Cascio MG, Fernández Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res*. 2002;954:73-81.
150. Maldonado R, Rodríguez de Fonseca F. Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci*. 2002; 22:3326-31.
151. Maldonado R. The neurobiology of addiction. *J Neural Transm Suppl*. 2003;66:1-14.
152. Stevens KE, Adams CE, David DJ, Gerhardt GA, Freedman R. Nitric oxide and nicotinic receptors: modulators of inhibitory gating in rat hippocampus. *Soc Neurosci Abs*. 1997;23:669.
153. Adams CE, Stevens KE. Inhibition of nitric oxide synthase disrupts inhibitory gating of auditory responses in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287:760-5.

154. Adams CE, Stevens KE, Kem WR, Freedman R. Inhibition of nitric oxide synthase prevents alpha7 nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. *Brain Res.* 2000;877:235-44.
155. Weruaga E, Aijón J, Alonso JR. Neurobiología de la nicotina y el óxido nítrico. *Prev Tab.* 2002;4(2):95-103.
156. Malin DH, Lake JR, Shenoi M, Upchurch TP, Johnson SC, Schweinle WE et al. The nitric oxide synthesis inhibitor nitro-L-arginine (L-NNA) attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology.* 1998;140:371-7.
157. Adams ML, Cicero TJ. Nitric oxide mediates mecamylamine- and naloxone-precipitated nicotine withdrawal. *Eur J Pharmacol.* 1998;345:1-2.
158. Vleeming W, Rambali B, Opperhuizen A. The role of nitric oxide in cigarette smoking and nicotine addiction. *Nicotine Tob Res.* 2002;4(3):341-8.
159. Mangold JE, Payne TJ, Ma JZ, Chen F, Li MD. Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans. *J Med Genet.* 2008;45:578-82.
160. Kim U, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science.* 2003;299:1221-5.
161. Breslau N, Johnson EO, Hiripi E, Kessler R. Nicotine dependence in the United States: prevalence, trends, and smoking persistence. *Arch Gen Psychiatry.* 2001;58(9):810-6.
162. Johnson EO, Chase GA, Breslau N. Persistence of cigarette smoking: familial liability and the role of nicotine dependence. *Addiction.* 2002;97(8):1063-70.
163. Lessov CN, Martin NG, Statham DJ, Todorov AA, Slutske WS, Bucholz KK, et al. Defining nicotine dependence for genetic research: evidence from Australian twins. *Psychol Med.* 2004;34(5):865-79.
164. Maes HH, Sullivan PF, Bulik CM, Neale MC, Prescott CA, Eaves LJ, et al. A twin study of genetic and environmental influences on tobacco initiation, regular tobacco use and nicotine dependence. *Psychol Med.* 2004;34(7):1251-61.
165. Prescott CA, Kendler KS, Fertig JB, Allen JP, editors. In: Genetic and environmental influences on alcohol and tobacco dependence among women. Bethesda, MD. 1995:59-87.
166. Merlo E, Heidbreder C, Mugnaini M, Teneggi V. Molecular and behavioral aspects of nicotine dependence and reward. *Molecular biology of drug addiction.* 2002:315-38.
167. Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;998:41-52.

168. Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*. 2004;306(5698):1029-32.
169. Nashmi R, Lester HA. CNS localization of neuronal nicotinic receptors. *J Mol Neuro*. 2006; 30:181-4.
170. Hansen ST, Mark GP. The nicotinic acetylcholine receptor antagonist mecamylamine prevents escalation of cocaine self-administration in rats with extended daily access. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;194:53-61.
171. Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, et al. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*. 1989;284:314-35.
172. Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*. 1992;41:31-7.
173. Corringer PJ, Le Novere N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:431-58.
174. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol*. 2005;346:967-89.
175. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 2009;89:73-120.
176. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:102-14.
177. Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N et al. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron*. 1990;5:847-56.
178. Schoepfer R, Conroy WG, Whiting P, Gore M, Lindstrom J. Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*. 1990;5:35-48.
179. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 1994;79:705-15.
180. Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:3501-6.
181. Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA. Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10). *Genomics*. 2001;73:272-83.

182. Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G et al. A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci*. 2009;29:918-29.
183. Boyd RT. The molecular biology of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Toxicol*. 1997; 27:299-318.
184. Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J. Orphan'alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromericacetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*. 1997;51:320-7.
185. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(2):102-14.
186. Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(9):482-91.
187. Mao D, Yasuda RP, Fan H, Wolfe BB, Kellar KJ. Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1693-9.
188. Chen D, Patrick JW. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem*. 1997;272(38):24024-9.
189. Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci*. 2001;21(5):1452-63.
190. Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, et al. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem*. 2004;11(1):60-9.
191. Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci*. 2003;23(8):3176-85.
192. Wu J, George AA, Schroeder KM, Xu L, Marxer-Miller S, Lucero L et al. Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(1):80-91.
193. Salminen O, Murphy KL, McIntosh JM, Drago J, Marks MJ, Collins AC et al. Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol*. 2004;65(6):1526-35.
194. Cui C, Booker TK, Allen RS, Grady SR, Whiteaker P, Marks MJ, et al. The beta3 nicotinic receptor subunit: a component of alpha-conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors that modulate dopamine release and related behaviors. *J Neurosci*. 2003;23:11045-53.

195. Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, et al. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci*. 2003;23:7820-9.
196. Lloyd GK, Williams M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292:461-7.
197. Americ SP, Holladay M, Williams M. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:1092-101.
198. Romanelli MN, Gratteri P, Guandalini L, Martini E, Bonaccini C, Gualtieri F. Central nicotinic receptors: structure, function, ligands, and therapeutic potential. *Chem Med Chem*. 2007;2:746-67.
199. Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: Evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol*. 2008;19(5-6):461-84.
200. Domino EF. Round table on nicotinic receptors in addiction: summary report. *Eur J Pharmacol*. 2000;393:315-20.
201. Improgo M, Scofield M, Tapper R, Gardner P. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. *Oncogene*. 2010;29:4874-84.
202. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. A gene based risk score identifies smokers and ex-smokers at high risk of lung cancer. *Respirology*. 2008;13(Suppl. 2):143.
203. Lou XY, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Crew KM, Li MD. Gene-based analysis suggests association of the nicotinic acetylcholine receptor beta1 subunit (CHRNA1) and M1 muscarinic acetylcholine receptor (CHRM1) with vulnerability for nicotine dependence. *Hum Genet*. 2006;120(3):381-9.
204. Greenbaum L, Kanyas K, Karni O, Merbl Y, Olender T, Horowitz A, et al. Why do young women smoke? I. Direct and interactive effects of environment, psychological characteristics and nicotinic cholinergic receptor genes. *Mol Psychiatry*. 2006; 223:113312-22.
205. Silverman MA, Neale MC, Sullivan PF, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, et al. Haplotypes of four novel single nucleotide polymorphisms in the nicotinic acetylcholine receptor beta2-subunit (CHRNA2) gene show no association with smoking initiation or nicotine dependence. *Am J Med Genet*. 2000;96(5):646-53.
206. Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, et al. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet*. 2007;16(1):24-35.
207. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PA, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet*. 2007a;16(1):36-49.
208. Hoft NR, Corley RP, McQueen MB, Schlaepfer IR, Huizinga D, Ehringer MA. Genetic association of the CHRNA6 and CHRNA3 genes with tobacco

- dependence in a nationally representative sample. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(3):698-706.
209. Dobelis P, Marks M, Whiteaker P, Balogh S, Collins A, Stitzel J. A polymorphism in the mouse neuronal 4 nicotinic receptor subunit results in an alteration in receptor function. *Mol Pharmacol*. 2002;62(2):334-42.
 210. Stitzel JA, Lu Y, Jimenez M, Tritto T, Collins AC. Genetic and pharmacological strategies identify a behavioral function of neuronal nicotinic receptors. *Behav Brain Res*. 2000;113(1-2):57-64.
 211. Feng Y, Niu T, Xing H, Xu X, Chen C, Peng S, et al. A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *Am J Hum Genet*. 2004;75(1):112-21.
 212. Li MD, Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Lou XY, Garcia V et al. Ethnic- and gender-specific association of the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene (*CHRNA4*) with nicotine dependence. *Hum Mol Genet*. 2005;14(9):1211-9.
 213. Saccone NL, Schwantes-An TH, Wang JC, Gruzca RA, Breslau N, Hatsukami D, et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (*CHRN*) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009a;150B(4):453-66.
 214. Hutchison KE, Allen DL, Filbey FM, Jepson C, Lerman C, Benowitz NL, et al. *CHRNA4* and Tobacco Dependence. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(9):1078-86.
 215. Marks M, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans Borgmeyer I, Heinemann SF, et al. Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci*. 1992;12:2765-84.
 216. Ramirez Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. Functional contributions of alpha 5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*. 1996;380:347-51.
 217. Groot-Kormelink PJ, Boorman JP, Sivilotti LG. Formation of functional alpha 3, beta 4, alpha 5 human neuronal nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes: a reporter mutation approach. *Br J Pharmacol*. 2001;134:789-96.
 218. Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci*. 2002;22:8785-9.
 219. Volkow N, Rutter J, Pollock JD, Shurtleff D, Baler R. Nicotine addiction and lung cancer susceptibility. *Molecular Psychiatry*. 2008;13:990-2.
 220. Stitzel JA, Dobelis P, Jimenez M, Collins AC. Long sleep and short sleep mice differ in nicotine-stimulated 86Rb⁺ efflux and alpha4 nicotinic receptor subunit cDNA sequence. *Pharmacogenetics*. 2001;4:331-9.
 221. Butt CM, Hutton SR, Stitzel JA, Balogh SA, Owens JC, Collins AC. A polymorphism in the alpha4 nicotinic receptor gene (*Chrna4*) modulates enhancement of nicotinic receptor function by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27:733-42.

222. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008;452(7187):638-42.
223. Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, et al. alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry*. 2008;(13):368-73.
224. Keskitalo K, Broms U, Heliövaara M, Ripatti S, Surakka I, Perola M, et al. Association of serum cotinine level with a cluster of three nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4) on chromosome 15. *Hum Mol Genet*. 2009;18:4007-12.
225. Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, et al. Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet*. 2010;42:448-53.
226. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet*. 2010;42:436-40.
227. The Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet*. 2010;42:441-7.
228. Gruzza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, et al. A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry*. 2008;64(11):922-9.
229. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzza RA, Xuei X, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry*. 2008;165:1163-71.
230. Saccone NL, Culverhouse RC, Schwantes-An TH, Cannon DS, Chen X, Cichon S, et al. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. In press: *PLoS Genet*. 2010 Aug 5;6(8). pii: e1001053.
231. Champiaux N, Han ZY, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, et al. Distribution and pharmacology of $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci*. 2002;22:1208-17.
232. Markou A, Paterson NE. The nicotinic antagonist methyllycaconitine has differential effects on nicotine self-administration and nicotine withdrawal in the rat. *Nicotine Tob Res*. 2001;3:361-73.
233. Grottick AJ, Trube G, Corrigan WA, Huwyler J, Malherbe P, Wyler R, et al. Evidence that nicotinic $\alpha 7$ receptors are not involved in the hyperlocomotor and rewarding effects of nicotine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294:1112-9.
234. Zeiger JS, Haberstick BC, Schlaepfer I, Collins AC, Corley RP, Crowley TJ, et al. The neuronal nicotinic receptor subunit genes (CHRNA6 and CHRNA3) are associated with subjective responses to tobacco. *Hum Mol Genet*. 2008;17(5):724-34.

235. Saccone N, Schwantes-An T, Wang J, Grucza R, Breslau N, Hatsukami D et al. Multiple cholinergic nicotinic receptor genes affect nicotine dependence risk in African and European Americans. *Genes, Brain and Behavior*. 2010;9(7):741-50.
236. Duga S, Solda G, Asselta R, Bonati MT, Dalprà L, Malcovati M et al. Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor *CHRNA5/A3/B4* gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet*. 2001;46:640-8.
237. Solda G, Boi S, Duga S, Fornasari D, Benfante R, Malcovati M, et al. In vivo RNA-RNA duplexes from human alpha3 and alpha5 nicotinic receptor subunit mRNAs. *Genes, Brain and Behavior*. 2005;345:155-64.
238. Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausen A, Dunn DM, Matsunami N, et al. A candidate gene approach identifies the *CHRNA5-A3-B4* region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet*. 2008 Jul 11;4(7):e1000125.
239. Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K et al. Assembly of human neuronal nicotinic receptor $\alpha 5$ subunits with $\alpha 3$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits. *J Biol Chem*. 1996;271:17656-65.
240. Sivilotti LG, McNeil DK, Lewis TM, Nassar MA, Schoepfer R, Colquhoun D. Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J Physiol*. 1997;500:123-38.
241. Greenbaum L, Lerer B. Differential contribution of genetic variation in multiple brain nicotinic cholinergic receptors to nicotine dependence: recent progress and emerging open questions. *Mol Psychiatry*. 2009;14:912-45.
242. Ehringer MA, McQueen MB, Hoft NR, Saccone NL, Stitzel JA, Wang JC, et al. Association of *CHRN* genes with "dizziness" to tobacco. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2010;153B(2): 600-9.
243. Breitling LP, Dahmen N, Mittelstraß K, Rujescu D, Gallinat J, Fehr C, et al. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-4 polymorphisms with nicotine dependence in 5500 Germans. *The Pharmacogenomics Journal*. 2009;9:219-24.
244. Hutchison KE, Allen DL, Filbey FM, Jepson C, Lerman C, Benowitz NL, et al. *CHRNA4* and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64:1078-86.
245. Straub RE, Sullivan PF, Ma Y, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, et al. Susceptibility genes for nicotine dependence: a genome scan and followup in an independent sample suggest that regions on chromosomes 2, 4, 10, 16, 17 and 18 merit further study. *Mol Psychiatry*. 1999;4(2):129-44.
246. Agrawal A, Hinrichs AL, Dunn G, Bertelsen S, Dick DM, Saccone SF, et al. Linkage scan for quantitative traits identifies new regions of interest for substance dependence in the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA) sample. *Drug Alcohol Depend*. 2008;93(12):12-20.

247. Gelernter J, Panhuysen C, Weiss R, Brady K, Hesselbrock V, Rounsaville B, et al. Genomewide linkage scan for cocaine dependence and related traits: significant linkages for a cocaine-related trait and cocaine-induced paranoia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;136(1):45-52.
248. Gelernter J, Panhuysen C, Wilcox M, Hesselbrock V, Rounsaville B, Poling J, Weiss R, et al. Genomewide linkage scan for opioid dependence and related traits. *Am J Hum Genet.* 2006;78(5):759-69.
249. Luo Z, Alvarado G, Hatsukami DK, Johnson EO, Bierut LB, Breslau N. Race differences in nicotine dependence in the Collaborative Genetic study of Nicotine Dependence (COGEND). *Nicotine Tob Res.* 2008;10(7):1223-30.
250. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerstrom KO. The Fagerstrom test for nicotine dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict.* 1991;86:1119-27.
251. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature.* 2008;452(7187):633-7.
252. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet.* 2008;40(5):616-22.
253. Falvella FS, Galvan A, Frullanti E, Spinola M, Calabro E, Carbone A, et al. Transcription deregulation at the 15q25 locus in association with lung adenocarcinoma risk. *Clin Cancer Res.* 2009;15:1837-42.
254. Marchand LL, Derby KS, Murphy SE, Hecht SS, Hatsukami D, Carmella SG, et al. Smokers with the CHRNA Lung Cancer–Associated Variants Are Exposed to Higher Levels of Nicotine Equivalents and a Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamine. *Cancer Res.* 2008;68:9137 .
255. Liu P, Vikis HG, Wang D, Lu Y, Wang Y, Schwartz AG, et al. Familial aggregation of common sequence variants on 15q24-25.1 in lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(18): 1326-30.
256. Li MD, Xu Q, Lou X-Y, Payne TJ, Ma JZ. Association and interaction analysis of variants in CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster with nicotine dependence in African and European Americans *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics.* 2010;153B(3):745-56.
257. Schwartz AG, Cote ML, Wenzlaff AS, Land S, Amos CI. Racial differences in the association between SNPs on 15q25.1, smoking behavior, and risk of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4(10):1195-201.
258. Shiraishi K, Kohno T, Shimada Y, Yokota J, Kunitoh H, Watanabe SI, et al. Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):65-70.
259. Wu C, Hu Z, Yu D, Huang L, Jin G, Liang J, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations. *Cancer Res.* 2009;69:5065-72.

260. Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al. The *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res.* 2009b; 69:6848-56.
261. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115:195-205.
262. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of Patients With Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease Have a Significant Risk of Airflow Obstruction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2001;164:1419-24.
263. Lara B. EPOC y déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol.* 2010;46(Supl 4):2-8.
264. Pillai SG, Shianna K, Ge D, et al. Genome-wide association study of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in a case control population from Norway. *American Thoracic Society, Toronto Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:776.
265. Sreekumar GP, Dongliang G, Guohua Z, Xiangyang K, Kevin V.S, Anna CN, et al. A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci. *PLoS Genet.* 2009;5(3):e1000421.
266. Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy.* 2005;60:1361-9.
267. Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation?. *Pharmacol Ther.* 2007;115:208-22.
268. Carlisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA, et al. Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibrosis. *Respir Res.* 2004;5:27-42.
269. Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Black PN, Gamble GD. Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect?. *Eur Respir J.* 2008;32(5):1158-64.
270. Brody JS, Spira A. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:535-8.
271. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med.* 1987;106:512-8.
272. Kuller LH, Ockene J, Meilahn E, Svendsen KH. Relation of forced expiratory volume in one second (FEV1) to lung cancer mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Am J Epidemiol.* 1990;132:265-74.

273. Engstrom G, Hedblad B, Valind S, Janzon L. Asymptomatic leg and carotid atherosclerosis in smokers is related to degree of ventilatory capacity: longitudinal and cross-sectional results from "Men born in 1914", Sweden. *Atherosclerosis*. 2001;155:237-43.
274. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med*. 2001;7:833-9.
275. Kiuchi K, Matsuoka M, Wu JC, Lima e Silva R, Kengatharan M, Verghese M, et al. Mecamylamine Suppresses Basal and Nicotine-Stimulated Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:1705-11.
276. Heeschen C, Chang E, Aicher A, Cooke JP. Endothelial Progenitor Cells Participate in Nicotine-Mediated Angiogenesis. *J Amer College Cardiol*. 2006;48:2553-60.
277. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-57.
278. Kato S, Amano H, Ito Y, Eshima K, Aoyama N, Tamaki H, et al. Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice. *J Pharmacol Sci*. 2010;112:167-75.
279. Ni M, Yang Z, Li D, Li Q, Zhang S, Su DF, et al. A Potential Role of Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in Cardiac Angiogenesis in a Pressure-Overload Rat Model. *J Pharmacol Sci*. 2010;114:311-9.
280. Dani JA, Harris RA. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat Neurosci*. 2005;8:1465-70.
281. Miller DK, Wong EH, Chesnut MD, Dwoskin LP. Reboxetine: functional inhibition of monoamine transporters and nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:687-95.
282. Garwood CL, Potts LA. Emerging pharmacotherapies for smoking cessation. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64:1693-8.
283. Labarca C, Schwarz J, Deshpande P, Schwarz S, Nowak MW, Fonck C, et al. Point mutant mice with hypersensitive $\alpha 4$ nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2786-91.
284. Marubio LM, Paylor R. Impaired passive avoidance learning in mice lacking central neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*. 2004;129:575-82.
285. Laje RP, Berman JA, Glassman AH. Depression and nicotine: preclinical and clinical evidence for common mechanisms. *Curr Psychiatry Rep*. 2001;3:470-4.
286. Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV, Sanberg PR. Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry*. 2002;7:525-35.

287. Rabenstein RL, Caldarone BJ, Picciotto MR. The nicotinic antagonist mecamylamine has antidepressant-like effects in wild-type but not β 2- or α 7-nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. *Psychopharmacology*. 2006;189:395-401.
288. Dalack GW, Healy DJ, Meador-Woodruff JH. Nicotine dependence in schizophrenia: clinical phenomena and laboratory findings. *Am J Psychiatry*. 1998;155:1490-501.
289. Freedman R, Leonard S, Gault JM, Hopkins J, Cloninger CR, Kaufmann CA, et al. Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the α 7-nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (*CHRNA7*). *Am J Med Genet*. 2001;105:20-2.
290. De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL. Genetic interaction between α 4 and β 2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Exp Brain Res*. 2006;174:292-6.
291. Schlaepfer Isabel R, Hoft Nicole R, Collins Allan C, Corley Robin P, Hewitt John K, Hopfer Christian J, et al. The *CHRNA5/A3/B4* gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biological psychiatry*. 2008;63(11):1039-46.
292. Wang JC, Grucza R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, et al. Genetic variation in the *CHRNA5* gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Molecular Psychiatry*. 2009;14:501-10.
293. Young EM, Mahler S, Chi H, de Wit H. Mecamylamine and ethanol preference in healthy volunteers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29:58-65.
294. Chi H, de Wit H. Mecamylamine attenuates the subjective stimulant-like effects of alcohol in social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27:780-6.
295. Le AD, Corrigall WA, Harding JW, Juzysch W, Li TK. Involvement of nicotinic receptors in alcohol self-administration. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:155-63.
296. Ehringer MA, Clegg HV, Collins AC, Corley RP, Crowley T, Hewitt JK, et al. Association of the neuronal nicotinic receptor beta2 subunit gene (*CHRN2*) with subjective responses to alcohol and nicotine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144(5):596-604.
297. Castles A, Adams EK, Melvin CL, Kelsch C, Boulton ML. Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses. *Am J Prev Med*. 1999;16:208-15.
298. Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine Tob Res*. 2004;6(Suppl 2):125-40.
299. Freathy R, Ring S, Shields B, Galobardes B, Knight B, Weedon M, et al. A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (*CHRNA5-CHRNA3-CHRN4*) is associated with a reduced ability of women to quit smoking in pregnancy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(15):2922-7.
300. Ramos PA, Mayayo UM, Alonso MJ, Amor BN, Conde VA, Flórez MS, et al. Abordaje del tabaquismo. *Manual de Procedimientos SEPAR*. 2007;13:7-81.

301. Lopez AD, Collishaw NE, Piha T. A descriptive model of the cigarette epidemic in developed countries. *Tob Control*. 1994;3(3):242-7.
302. Macías Castro I. El hábito de fumar y la salud. *Rev Cubana Med*. 1985;24:645.
303. Rovne AM, Smick M. Effect of smoking the cardiovascular system of man. *Circulation*. 1958;27:443.
304. Warren CW, Jones NR, Eriksen MP, Asma S. Global Tobacco Surveillance System (GTSS) collaborative group. Patterns of global tobacco use in young people and implications for future chronic disease burden in adults. *Lancet*. 2006;367:749-53.
305. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med*. 2002;347:1512-20.
306. Rempel N, Heyers S, Engels H, Slegers E, Steinlein OK. The structures of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta2- and alpha3-subunit genes (CHRNA2 and CHRNA3). *Hum Genet*. 1998;103(6):645-53.
307. Congleton J, Muers MF. The incidence of airflow obstruction in bronchial carcinoma, its relation to breathlessness, and response to bronchodilator therapy. *Respir Med*. 1995;89:291-6.
308. Munafò MR, Johnstone EC, Walther D, Uhl GR, Murphy MF, Aveyard P. CHRNA3 rs1051730 Genotype and Short-term Smoking Cessation. *Nicotine Tob Res*. 2011 Jun 20. [Epub ahead of print].
309. Yakir A, Rigbi A, Kanyas K, Pollak Y, Kahana G, Karni O, et al. Why do young women smoke? III. Attention and impulsivity as neurocognitive predisposing factors. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17:339-51.
310. Rigbi A, Kanya K, Yakir A, Greenbaum L, Pollak Y, Ben-Asher E, et al. Why do young women smoke? V. Role of direct and interactive effects of nicotinic cholinergic receptor gene variation on neurocognitive function. *Genes, Brain and Behavior*. 2008;7(2):164-72.
311. Barman SK, Pulkkinen L, Kaprio J, Rose RJ. Inattentiveness, parental smoking and adolescent smoking initiation. *Addiction*. 2004; 99:1049-61.
312. Wilkinson D, Abraham C. Constructing an integrated model of the antecedents of adolescent smoking. *Br J Health Psychol*. 2004;9(Part 3):315-33.
313. Greenbaum L, Kanyas KS, Rigbi A, Alkelai A, Kohn Y, Lerer B. Why do young women smoke? VII COMT as a risk modifying gene for Nicotine dependence - role of gene-gene interaction, personality, and environmental factors. *Hum Psychopharmacol*. 2010;25(7-8):536-42.
314. Janes AC, Smoller JW, David SP, Frederick BD, Haddad S, Basu A, et al. Association between CHRNA5 genetic variation at rs16969968 and brain reactivity to smoking images in nicotine dependent women. *Drug Alcohol Depend*. 2011 [Epub ahead of print].
315. Winterer G, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Fehr C, Brenner, et al. Risk gene variants for nicotine dependence in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4

- cluster are associated with cognitive performance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010;5:1448-58.
316. Cohen C, Perrault G, Griebel G, Soubrie P. Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). *Neuropsychopharmacology.* 2005;30:145-55.
 317. Ferguson SG, Shiffman S. The relevance and treatment of cue-induced cravings in tobacco dependence. *J Subst Abuse Treat.* 2009;36:235-43.
 318. Janes AC, Pizzagalli DA, Richardt S, Frederick B, Chuzi S, Pachas G, et al. Brain reactivity to smoking cues prior to smoking cessation predicts ability to maintain tobacco abstinence. *Biol Psychiatry.* 2010;67:722-9.
 319. Kosten TR, Scanley BE, Tucker KA, Oliveto A, Prince C, Sinha R, et al. Cue-induced brain activity changes and relapse in cocaine-dependent patients. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31:644-50.
 320. Porrino LJ, Lyons D, Smith HR, Daunais JB, Nader MA. Cocaine self-administration produces a progressive involvement of limbic, association, and sensorimotor striatal domains. *J Neurosci.* 2004;24:3554-62.
 321. Mazure CM, Toll B, McKee SA, Wu R, O'Malley SS. Menstrual cycle phase at quit date and smoking abstinence at 6 weeks in an open label trial of bupropion. *Drug Alcohol Depend.* 2011;114:68-72.
 322. Franklin TR, Wang Z, Wang J, Sciortino N, Harper D, Li Y, et al. Limbic activation to cigarette smoking cues independent of nicotine withdrawal: a perfusion fMRI study. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32:2301-9.
 323. McClernon FJ, Kozink RV, Rose JE. Individual differences in nicotine dependence, withdrawal symptoms, and sex predict transient fMRI BOLD responses to smoking cues. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33:2148-57.
 324. Talairach J, Tournoux P. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. Thieme, New York. 1988.
 325. Breslau N, Peterson EL. Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *Am J Public Health.* 1996;86:214-20.
 326. Chassin L, Presson CC, Rose JS, Sherman SJ. The natural history of cigarette smoking from adolescence to adulthood: demographic predictors of continuity and change. *Health Psychol.* 1996;15(6):478-84.
 327. Chen J, Millar WJ. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Rep.* 1998;9:39-46.
 328. Lando HA, Thai DT, Murray DM, Robinson LA, Jeffery RW, et al. Age of initiation, smoking patterns, and risk in a population of working adults. *Prev Med.* 1999;29:590-8.
 329. Chen X, Stanton B, Shankaran S, Li X. Age of smoking onset as a predictor of smoking cessation during pregnancy. *Am J Health Behav.* 2006;30:247-58.

330. Hymowitz N, Cummings KM, Hyland A, Lynn WR, Pechacek TF, et al. Predictors of smoking cessation in a cohort of adult smokers followed for five years. *Tobacco Control*. 1997;6:57-62.
331. John U, Meyer C, Hapke U, Rumpf HJ. Nicotine dependence and lifetime amount of smoking in a population sample. *Eur J Public Health*. 2004;14:182-5.
332. Grant BF. Age at smoking onset and its association with alcohol consumption and DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse*. 1998;10:59-73.
333. John U, Meyer C, Rumpf HJ, Schumann A, Hapke U. Consistency or change in nicotine dependence according to the Fagerstrom Test for Nicotine Dependence over three years in a population sample. *J Addict Dis*. 2005;24:85-100.
334. Pergadia ML, Heath AC, Martin NG, Madden PA. Genetic analyses of DSM-IV nicotine withdrawal in adult twins. *Psychol Med*. 2006;36:963-72.
335. Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud. Madrid. 2009.
336. Adriani W, Spijker S, Deroche-Gamonet V, Laviola G, Le Moal M, et al. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J Neurosci*. 2003;23:4712-6.
337. Belluzzi JD, Wang R, Leslie FM. Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:705-12.
338. Levin ED, Rezvani AH, Montoya D, Rose JE, Swartzwelder HS. Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. *Psychopharmacology*. 2003;69:141-9.
339. Vastola BJ, Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol Behav*. 2002;77:107-14.
340. Adriani W, Macri S, Pacifici R, Laviola G. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27:212-24.

ABREVIATURAS

AAs: Afro-americanos
AEs: Americanos europeos
A1AT: Alfa-1 antitripsina
ATV: Área Tegmental Ventral
 Δ 9-THC: (-)- Δ 9-6a,10a-trans-tetrahidrocannabinol
CEN: Centrómero
CHRNA3A5B4: Receptor nicotínico de acetilcolina subunidades α 3 α 5 β 4
CIAA: Cloroformo / alcohol isoamílico
CO: Monóxido de carbono
COMT: Metiltransferasa catecol-metiltransferasa
CYP: Citocromo P
5-HTT: Proteína transportadora de la serotonina
DAT: Transportador de dopamina
DBH: Dopamina betahidroxilasa
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DOPA: Dopamina
DR: Receptor de la dopamina
EAP: Enfermedad arterial periférica
EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg
EPOC: Enfermedad Pulmonar obstructiva crónica
FEV1: Flujo espirado en el primer segundo
fMRI: Resonancia magnética cerebral funcional
GABA: Ácido gamma-amino-butírico
IL: Interleucina
LC: Locus Coeruleus
MAO: Monoaminooxidasa
nAChRs: Receptores nicotínicos de acetilcolina
NO: Óxido nítrico
NOS: NO-sintetasa
OCR: Tasa de concordancia global
PB: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
SAN: Síndrome de abstinencia
SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SNP: Nucleótido de polimorfismo único (*Single nucleotide polymorphism*)
SPSS: Statistical Package for the Social Science
STR: Repeticiones cortas en tándem (*Short tandem repeat*)
TEL: Telómero
TH: Tirosina-hidroxilasa
TPH: Triptofano-hidroxilasa
UET: Unidad Especializada de tabaquismo de Tabaquismo
VNTR: Número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeat*)

