

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS
DEL SISTEMA OPIOIDE Y ENDOCANNABINOIDE EN
LA DEPENDENCIA ALCOHÓLICA**



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

Cristina de la Calle Cabrera
2014

D. FRANCISCO JAVIER LASO GUZMÁN. CATEDRÁTICO DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D. MIGUEL MARCOS MARTÍN. PROFESOR ASOCIADO DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Influencia de los polimorfismos genéticos del sistema opioide y endocannabinoide en la dependencia alcohólica”** que presenta Dña. Cristina de la Calle Cabrera, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenido suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 14 de enero de 2014.

Fdo: F. J. Laso Guzmán

Fdo: M. Marcos Martín

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Breve reseña histórica	3
Epidemiología del consumo de alcohol	4
Concepto de alcoholismo y patrones de consumo de alcohol	5
Diagnóstico del consumo excesivo de alcohol	8
Metabolismo del etanol	9
Patología relacionada con el alcohol	12
Neurobiología del alcohol: mecanismos de acción del alcohol en las diferentes vías de neurotransmisión	16
Neurobiología del alcohol: tolerancia, abstinencia y acciones en el circuito de recompensa cerebral	20
Tolerancia	21
Abstinencia	21
Papel del etanol en el circuito de recompensa cerebral: propiedades reforzadoras	22
Factores genéticos implicados en el desarrollo de alcoholismo	24
Polimorfismos del sistema opioide	27
Polimorfismos del sistema endocannabinoide	33
OBJETIVOS	35
PACIENTES Y MÉTODOS	39

Pacientes	41
Extracción del ADN	41
Amplificación del ADN	42
Polimorfismos estudiados	45
Métodos estadísticos	60
Análisis estadístico de cada polimorfismo	60
Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	61
Cálculo de la potencia estadística	61
RESULTADOS	63
Gen <i>OPRM1</i>	65
Polimorfismo rs1799971 (A118G)	65
Polimorfismo rs2075572 (G691C)	67
Polimorfismo rs540825	69
Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	70
Gen <i>OPRD1</i>	72
Polimorfismo rs1042114 (T80G)	72
Polimorfismo rs2234918 (T921C)	73
Polimorfismo rs4654327	74
Polimorfismo rs678849	75
Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	77
Gen <i>OPRL1</i>	80
Polimorfismo rs2229205	80
Gen <i>PNOG</i>	81
Polimorfismo rs351779	81
Polimorfismo rs17058952	82
Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	83
Gen <i>OPRK1</i>	85
Polimorfismo rs702764 (T843C)	85
Polimorfismo rs1051660 (C36T)	86
Polimorfismo rs963549	88
Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	89

Gen <i>CNR1</i>	90
Polimorfismo rs1049353 (C1359T)	90
Polimorfismo rs6454674	92
Polimorfismo rs806368	93
Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	94
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO I	143

INTRODUCCIÓN

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Los orígenes del término alcohol son inciertos; mientras que algunos autores afirman que proviene del árabe *al-kukhāl*, el espíritu, hay quien sostiene que el origen está en la palabra árabe *Kohól*, polvo finísimo a base de minerales que utilizaban las mujeres de cierta categoría social para maquillarse ¹.

Los indicios más antiguos de consumo de vino datan del año 8000 a.C., dado que de esta época se han datado semillas de uva de *vitis vinifera* encontradas en Turquía y El Líbano ². En el antiguo Egipto, la vid era el segundo cultivo en importancia, tras los cereales, y se sabe que también se bebía cerveza, aunque esta era poco apreciada entre las clases sociales elevadas. Asimismo, en las sociedades griega y romana el vino era una bebida muy apreciada, y su consumo se generalizó en todas las clases sociales ³.

En la península ibérica, el cultivo del vino se relega a la mínima expresión durante la dominación árabe, pero esta situación cambia ante el avance cristiano y el asentamiento definitivo de las órdenes monásticas, que incrementan de nuevo el cultivo y producción de vino, que se incorpora a la dieta humana como un aporte hídrico y calórico fundamental ⁴. El avance tecnológico permite que en el siglo XV se establezca en numerosas ciudades el gremio de destiladores, y existen abundantes documentos que hacen referencia también al cultivo del vino. Ello estaba muy ligado al feudalismo, que basaba parte de su economía en la vid y los cereales.

El amplio consumo de alcohol a lo largo de la historia se debe, en parte, a sus potenciales aplicaciones, entre las que destaca su papel como bebida de consumo en tiempos en los que era difícil encontrar agua potable. Fue también ampliamente usado en Medicina como método para paliar el dolor o reducir la fiebre, y es indudable que el alcohol, más que un simple bebida, era reconocido como un factor de integración social y una forma de celebrar acontecimientos, dada su capacidad para desinhibir y provocar sensaciones de bienestar.

No es hasta el siglo XVI cuando comienza a cambiar en Europa el concepto que se tiene de las bebidas alcohólicas, pensamiento iniciado por los reformadores encabezados por Lutero, quien no se cansaba de predicar contra el “diablo de la bebida”⁵. Gracias a la llegada y difusión en Europa de las bebidas calientes, como el café, se logró descender el consumo de bebidas alcohólicas entre las clases elevadas y la burguesía, que comenzó a repudiar la costumbre de beber sin medida. Para las clases inferiores, sin embargo, el alcohol y la embriaguez no eran considerados un estigma social, sino una expresión de la “alegría de vivir” y una forma de diversión con la que evadirse durante unas horas de la realidad ⁶.

A partir del siglo XIX comienzan a surgir en Estados Unidos organizaciones que promocionan la abstinencia del consumo de bebidas alcohólicas, creándose las primeras ligas antialcohólicas en Nueva York (1808), Massachusetts (1813) y Connecticut (1813). En Europa este tipo de organizaciones se fundaron en las décadas de 1820 y 1830, siendo las más importantes las de Gran Bretaña y de los países escandinavos, mientras que en España apenas tuvo una repercusión anecdótica ⁷. Probablemente, el intento más serio para acabar con el consumo de alcohol lo podemos encontrar en la primera mitad del siglo XX, cuando Estados Unidos promulga la Ley Volstead ⁸, conocida universalmente como “Ley Seca”, que prohíbe contundentemente la producción, suministro y consumo de alcohol. Esta ley estuvo vigente trece años, hasta 1933, siendo finalmente abolida.

En la actualidad, el alcohol es una de las sustancias de abuso que, por su fácil acceso, se ha convertido en un verdadero problema sociosanitario en numerosos países, y acarrea graves repercusiones médicas y sociales.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CONSUMO DE ALCOHOL

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁹, el consumo excesivo de alcohol es responsable de la muerte de 2,5 millones de personas anualmente en el mundo. En 2005 la media de consumo mundial fue de 6,13 litros de alcohol puro por persona mayor de 15 años, siendo Europa una de las regiones con un mayor consumo, con niveles superiores a 10 litros de alcohol puro al año por persona en prácticamente todos los países ⁹. Sin embargo, a medida que otras partes del mundo se desarrollan económicamente, también aumentan los niveles de consumo de alcohol y el daño relacionado con dicho tóxico.

En Europa, el alcohol constituye el tercer factor de riesgo más importante que contribuye a la morbimortalidad total, según datos de la Oficina Regional para Europa de la OMS ¹⁰, sólo superado por la hipertensión arterial y el tabaquismo, y representa asimismo el principal factor de riesgo de morbimortalidad entre los jóvenes. Los fallecimientos relacionados con el alcohol suponen el 6,3% del total, y si tomamos en consideración los años de vida perdidos debido a mortalidad prematura, así como los años de vida vividos con discapacidad, la importancia del alcohol es incluso más elevada, siendo los varones y el grupo de edad entre 15 y 30 años el más afectado. El efecto perjudicial del alcohol parece ser más pronunciado cuando se combina con pobreza y malnutrición. Además, no debemos olvidar que el alcohol contribuye significativamente al desarrollo de problemas sociales, familiares y laborales. Ante esta

situación, la Oficina Regional de la OMS para Europa fue, en 1992, la primera entidad regional de la OMS en llevar a cabo la iniciativa de lanzar un plan de actuación sobre el alcohol, con un conjunto de medidas para el control del consumo en Europa ¹⁰.

En España, según datos del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad ¹¹, en 2008 se produjeron 24 339 defunciones relacionadas con el consumo de alcohol, siendo 1626 de ellas directamente atribuibles a esta sustancia. Los datos publicados de los años 2011 y 2012 en la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) ¹² revelan que más de un 60 % de la población española entre 15 y 64 años había consumido alguna vez bebidas alcohólicas en los últimos 30 días. Además, aunque está estabilizada o en descenso la proporción de consumidores de bebidas alcohólicas, ha aumentado en los últimos años la frecuencia de episodios de consumo intensivo o borracheras, sobre todo entre los jóvenes. En 2011, un 41,3 % de los hombres y un 23,5% de las mujeres con edades comprendidas entre los 15 y los 34 años se había emborrachado alguna vez en los últimos 12 meses ¹².

Todos estos datos reafirman la preocupación sobre el grave problema de salud pública que supone el consumo excesivo de alcohol, debido a los importantes costes socioeconómicos y sanitarios en términos de morbilidad, utilización de servicios sanitarios, pérdidas de productividad, así como las consecuencias derivadas de accidentes de tráfico y conductas delictivas relacionadas con el consumo.

CONCEPTO DE ALCOHOLISMO Y PATRONES DE CONSUMO DE ALCOHOL

El término alcoholismo es impreciso y se usa únicamente para describir una situación en la que el consumo de alcohol es excesivo o resulta perjudicial para el sujeto, por lo que resulta mucho más adecuado utilizar los términos de “consumo de riesgo”, “consumo perjudicial” o “dependencia” definidos por la OMS ¹³.

La unidad de medida utilizada para cuantificar el consumo de alcohol es la UBE (Unidad de Bebida Estándar), que en España equivale a 10 gramos de etanol puro, y corresponde a un vaso de vino, una caña de cerveza, o medio vaso de bebida destilada como whisky o coñac ¹⁴. Según las directrices de la OMS, se considera consumo de riesgo de alcohol, en varones, a la ingesta de, al menos, 28 UBE por semana o más de 5 UBE por ocasión de consumo. En mujeres y mayores de 65 años, el límite está en 17 UBE a la semana o más de 3 UBE por ocasión de consumo. El patrón de ingesta de grandes cantidades de alcohol en una sola ocasión se ha

denominado *binge drinking* en la literatura anglosajona, que podría traducirse por “consumo concentrado”, “consumo en atracones” o “botellón”, que con frecuencia realizan los jóvenes en nuestro país.

Según los criterios de la clasificación internacional de enfermedades (CIE-10) de la OMS ¹³ existen tres patrones de consumo de alcohol:

- Consumo de riesgo: se superan los niveles anteriormente mencionados, sin consecuencias directas relacionadas con el consumo de alcohol pero con riesgo futuro de daño psicológico, social y físico.

- Consumo perjudicial: existe daño físico, psíquico, familiar, social, legal o económico asociado al consumo.

- Dependencia alcohólica: sus criterios se exponen en la tabla 1.

Por su parte, la Asociación Americana de Psiquiatría en el DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition*) ¹⁵ define los diferentes patrones de consumo de alcohol con dos términos. Además de la dependencia de alcohol, utiliza el concepto “**abuso de alcohol**”, que continúa siendo muy utilizado. Este patrón se caracteriza por un uso de alcohol que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, manifestado por uno o más de los siguientes, durante un periodo de doce meses:

- Incumplimiento de obligaciones en el trabajo, en la escuela o en casa.
- Consumo recurrente del alcohol en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso.
- Problemas legales repetidos relacionados con el alcohol.
- Problemas sociales continuos o recurrentes.
- Problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos del alcohol.

Tabla 1. Criterios de la CIE-10 para el diagnóstico de dependencia

<ul style="list-style-type: none">● Tolerancia, de tal manera que:<ul style="list-style-type: none">- Se requiere un aumento progresivo de la dosis de alcohol para conseguir los mismos efectos que originalmente producían dosis más bajas; lograr la intoxicación o conseguir el efecto deseado- Se obtiene un efecto marcadamente disminuido con el uso continuado de la misma cantidad de alcohol● Síntomas somáticos de un síndrome de abstinencia, cuando se confirme por:<ul style="list-style-type: none">- El síndrome de abstinencia característico del alcohol con el cese o disminución del consumo- El consumo de la misma sustancia (o una muy próxima) con la intención de aliviar o evitar los síntomas de abstinencia● Deseo intenso o vivencia de una compulsión a consumir alcohol● Disminución de la capacidad para controlar el consumo de alcohol, unas veces para controlar el inicio del consumo y otras para poder terminarlo o para controlar la cantidad consumida, demostrado por:<ul style="list-style-type: none">- El alcohol se consume en mayores cantidades o durante un período más largo de lo que se pretendía inicialmente- Existen deseos persistentes o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el uso de alcohol● Preocupación con el alcohol, tal como se manifiesta por:<ul style="list-style-type: none">- Abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversiones a causa del consumo de alcohol- Aumento del tiempo necesario para obtener o ingerir el alcohol o para recuperarse de sus efectos● Persistencia en el consumo de alcohol a pesar de sus evidentes consecuencias perjudiciales, tal y como se evidencia por el consumo continuado una vez que el individuo es consciente, o era de esperar que lo fuera, de la naturaleza y extensión del daño <p>Tres o más de estas manifestaciones deben haber estado presentes durante al menos un mes o, si han durado menos de un mes, deben haber aparecido juntas de forma repetida en algún período de doce meses</p>
--

En todo caso, la nueva clasificación DSM-V, de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA), publicada en mayo de 2013, sustituye los términos de abuso y dependencia de alcohol por el de “Trastorno por uso de alcohol”¹⁶, cuyos criterios se exponen en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de la APA para el trastorno por uso de alcohol (DSM-V)

Trastorno por uso del alcohol	
Patrón desadaptativo de consumo de alcohol que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por <i>dos (o más)</i> de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:	
Ítem 1	La sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía
Ítem 2	Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de alcohol
Ítem 3	Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con el consumo o la obtención de alcohol
Ítem 4	Deseo de consumo irrefrenable
Ítem 5	Incumplimiento de obligaciones
Ítem 6	Consumir alcohol a pesar de sus consecuencias en las relaciones familiares e interpersonales
Ítem 7	Reducción de actividades sociolaborales, familiares o recreativas
Ítem 8	Consumo de alcohol en situaciones peligrosas
Ítem 9	Persistencia del consumo a pesar de las consecuencias físicas o psicológicas causadas o exacerbadas por el consumo de alcohol
Ítem 10	Tolerancia
Ítem 11	Abstinencia
Criterios de gravedad	Leve: 2-3 ítems Moderado: 4-5 ítems Grave: 6-11 ítems

DIAGNÓSTICO DEL CONSUMO EXCESIVO DE ALCOHOL

Existen varios cuestionarios usados en la población para cribado e identificación precoz de los consumidores de riesgo, como el ISCA (Interrogatorio Sistematizado de Consumo de Alcohol) o el CBA (Cuestionario Breve para

Alcohólicos), aunque los de mayor difusión son el CAGE y el AUDIT ^{17, 18}. El CAGE (acrónimo obtenido a partir de su versión inglesa: *Cut, Annoyed, Guilty, Eye-opener*) es un test muy sencillo de cuatro preguntas, útil en el cribado de alcoholismo. El AUDIT (*Alcohol use disorders identification test*) consta de diez preguntas (tabla 3) sobre la cantidad y frecuencia de alcohol consumido, así como las consecuencias de dicho consumo, por lo que es eficaz para detectar diferentes patrones de consumo en función de los puntos de corte.

METABOLISMO DEL ETANOL

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es el componente que define a las diferentes bebidas alcohólicas, y responsable de sus efectos sobre el organismo. Es una molécula anfipática, que penetra con facilidad a través de las membranas celulares, alcanzando su concentración máxima a los 30-60 min de su ingesta. Se absorbe por difusión simple por la mucosa de todo el tubo digestivo, en mayor proporción en el estómago (20%) y en la parte proximal del intestino delgado (80%). Su volumen de distribución es distinto en el varón (0,7 L/Kg) que en la mujer (0,6 L/Kg), principalmente por su diferente composición corporal, ya que se trata de una molécula más hidrosoluble que liposoluble ¹⁹. No se une a proteínas plasmáticas, y es capaz de atravesar la barrera placentaria y hematoencefálica. Además de realizar la determinación de su concentración en la sangre, también puede cuantificarse en el aire exhalado, ya que el etanol accede a los pulmones y se vaporiza en el aire a una velocidad constante.

Respecto a su eliminación, una pequeña proporción del alcohol ingerido se excreta directamente por el pulmón, riñón o en el sudor ²⁰, pero la mayor parte se metaboliza en el hígado por oxidación. La vía metabólica más importante se localiza en el citosol de los hepatocitos, donde la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), transforma el etanol en acetaldehído ¹⁹ (Figura 1). Existen otras dos vías de oxidación del etanol a acetaldehído en el hígado. Una de ellas, que tiene lugar en los microsomas del retículo endoplásmico liso, es el sistema conocido como MEOS (*microsomal ethanol-oxidizing system*) ²¹, actúa principalmente cuando las concentraciones de etanol en sangre son altas o su consumo es crónico. Este sistema enzimático es un componente de la familia de los citocromos microsomales P450, y la denominación actual más extendida para este sistema P450 es CYP2E1.

Tabla 3. Test AUDIT (*Alcohol use disorders identification test*)

1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?

- 0. Nunca
- 1. Una o menos veces al mes
- 2. De 2 a 4 veces al mes
- 3. De 2 a 3 veces a la semana
- 4. Cuatro o más veces a la semana

2. ¿Cuántas consumiciones de bebidas alcohólicas suele realizar en un día de consumo normal?

- 0. Una o 2
- 1. Tres o 4
- 2. Cinco o 6
- 3. De 7 a 9
- 4. Diez o más

3. ¿Con qué frecuencia toma 6 o más bebidas alcohólicas en una sola ocasión de consumo?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

4. ¿Con qué frecuencia en el curso del año ha sido incapaz de parar de beber una vez había empezado?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

5. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no pudo hacer lo que se esperaba de usted porque había bebido?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

6. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha necesitado beber en ayunas para recuperarse después de haber bebido mucho el día anterior?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

Tabla 3 (continuación)

7. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año ha tenido remordimientos o sentimientos de culpa después de haber bebido?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

8. ¿Con qué frecuencia en el curso del último año no ha podido recordar lo que sucedió la noche anterior porque había estado bebiendo?

- 0. Nunca
- 1. Menos de una vez al mes
- 2. Mensualmente
- 3. Semanalmente
- 4. A diario o casi a diario

9. ¿Usted o alguna otra persona han resultado heridos porque usted había bebido?

- 0. No
- 1. Sí, pero no en el curso del último año
- 2. Sí, el último año

10. ¿Algún familiar, amigo, médico o profesional sanitario han mostrado preocupación por su consumo de bebidas alcohólicas o le han sugerido que deje de beber?

- 0. No
- 1. Sí, pero no en el curso del último año
- 2. Sí, en el último año

Puntos de corte: Sin problemas: hombres 0-7; mujeres 0-5. Bebedor de riesgo: hombres 8-12; mujeres 6-12. Problemas físico/psíquicos y probable dependencia alcohólica: hombres 13-40; mujeres 13-40.

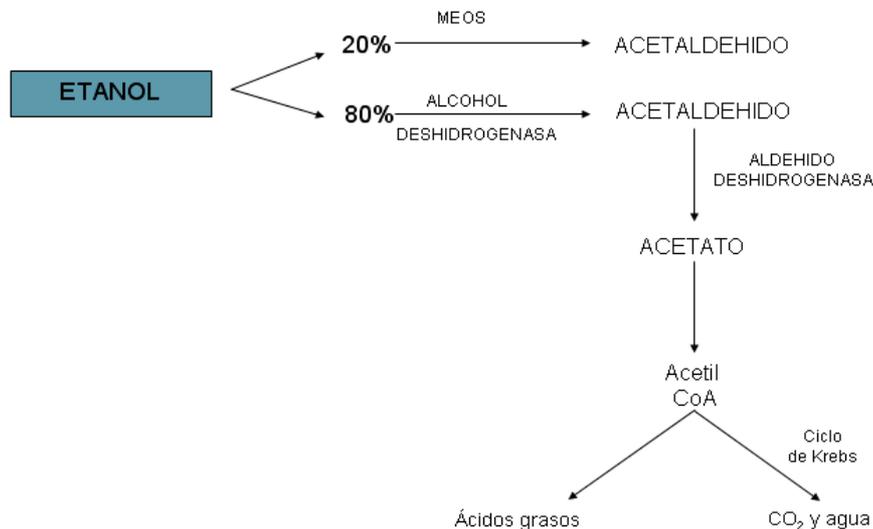
Una segunda vía metabólica alternativa corresponde a la de las catalasas, enzimas localizadas en los peroxisomas y en las mitocondrias de los hepatocitos; parece estar implicada en la oxidación del etanol cuando las concentraciones de este son elevadas²², aunque constituiría tan sólo un 2% de la oxidación total²³.

El acetaldehído es metabolizado a acetato, principalmente por la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH), en el citosol y las mitocondrias. A su vez, el acetato resultante se transforma en acetil-coenzima A, que es oxidado a CO₂ y H₂O en el ciclo de Krebs, o bien constituye el primer eslabón en la biosíntesis de ácidos grasos.

Asimismo, aunque de mucha menor importancia, existe un metabolismo oxidativo extrahepático del etanol en diferentes órganos, como el corazón, estómago

²⁴, riñón ²⁵ o cerebro ²⁶, y vías de metabolismo no oxidativas que se desarrollan a partir de la formación de ésteres etílicos de los ácidos grasos ²⁷ y fosfatidil-etanol ²⁸.

Figura 1. Principales vías de metabolismo del etanol



Modificado de: Harrison: Principios de Medicina Interna. 17ª Edición. Cap 387 Alcohol y Alcoholismo.

PATOLOGÍA RELACIONADA CON EL ALCOHOL

El etanol ejerce efectos tóxicos sobre un gran número de aparatos y sistemas del organismo. La revisión exhaustiva de todas las consecuencias negativas de la ingesta de alcohol escapa a los objetivos de este trabajo, pero a continuación se resumen las repercusiones más importantes.

Sistema nervioso central (SNC)

El alcohol es un depresor del SNC al actuar sobre diversos neurotransmisores; fundamentalmente potencia la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) e inhibe las acciones del neurotransmisor excitador glutamato. Estos aspectos referidos a la neurobiología se expondrán detenidamente al referirse más adelante a la dependencia alcohólica.

Las acciones del etanol sobre el SNC dependen de su concentración en sangre, del tipo de consumo, agudo o crónico, y de características del propio consumidor. En concreto, los efectos de una intoxicación aguda en función de la concentración alcanzada de etanol en sangre se reflejan en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto de las concentraciones de alcohol en sangre en un sujeto sin tolerancia.

CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA	EFEECTO
0,02 g/ 100 mL	Disminución de las inhibiciones Sensación de ebriedad, excitación
0,08 g/100 mL	Disminución de funciones cognitivas complejas y del rendimiento motor
0,20 g/100 mL	Incoordinación motora, irritabilidad, disminución de la percepción del riesgo
0,30 g/100 mL	Coma superficial Alteración de los signos vitales
0,40 g/100 mL	Muerte

Modificado de: Harrison: Principios de Medicina Interna. 17º Edición. Cap 387 Alcohol y Alcoholismo.

El síndrome de abstinencia alcohólica surge tras la interrupción o disminución de un consumo prolongado de grandes cantidades de alcohol. Se caracteriza por la aparición de dos o más de los siguientes síntomas, horas o días tras el cese del consumo:

- Hiperactividad autonómica
- Temblor distal de manos
- Náuseas o vómitos
- Insomnio
- Ansiedad
- Agitación psicomotora
- Alucinaciones visuales, táctiles o auditivas transitorias o ilusiones (delirium tremens)
- Crisis cólicas.

El consumo crónico y continuado de alcohol puede ocasionar problemas cognitivos derivados de una atrofia encefálica, presente hasta en el 50 % de los alcohólicos crónicos, así como atrofia cerebelosa, puesta de manifiesto por inestabilidad y alteraciones de la marcha. Como consecuencia del déficit de tiamina, puede producirse la tríada clásica del síndrome de Wernicke (oftalmoplejía, ataxia y encefalopatía) ²⁹ y el de Korsakoff (amnesia anterógrada y retrógrada). Menos comunes son el síndrome de Marchiafava-Bignani, una desmielinización del cuerpo calloso que cursa con síntomas de afectación frontal bilateral y disfunción hemisférica,

y la mielínólisis pontina central, rara enfermedad desmielinizante que afecta a la protuberancia.

Por otra parte, es frecuente la coexistencia del alcoholismo con trastornos psiquiátricos independientes del alcohol (patología dual), como esquizofrenia, trastorno bipolar o trastornos de ansiedad, y muchos síndromes psiquiátricos surgen durante el estado de embriaguez o durante la abstinencia posterior, como el trastorno del ánimo inducido por alcohol, ansiedad, alucinaciones o delirios paranoides.

Sistema nervioso periférico

La neuropatía alcohólica es una polineuropatía axonal, sensitivo-motora, de predominio distal, de inicio en extremidades inferiores, y de un curso insidioso y progresivo³⁰.

Aparato gastrointestinal

El consumo de alcohol provoca inflamación de la mucosa esofágica y gástrica. Es asimismo responsable de hasta un tercio del total de pancreatitis agudas y de la gran mayoría de casos de pancreatitis crónica. Asimismo, el alcohol es capaz de producir un amplio espectro de alteraciones en el hígado, desde la esteatosis hepática alcohólica hasta la cirrosis hepática, pasando por la hepatitis aguda³¹.

Neoplasias

El consumo excesivo de alcohol se ha relacionado con el incremento en la incidencia de un amplio abanico de tumores, entre los que destacan el cáncer de mama, los tumores de faringe y laringe, el carcinoma orofaríngeo, esofágico, gástrico, hepatocarcinoma y el cáncer de colon y recto.

Sistema hematopoyético e inmune

Además del incremento en el volumen corpuscular medio de los hematíes, por efecto tóxico directo sobre los eritroblastos, el alcohol puede determinar una trombocitopenia leve, actuando sobre los megacariocitos. Altera también el sistema inmune, al disminuir la producción leucocitaria, la movilidad y adherencia de los granulocitos y la respuesta de hipersensibilidad tardía a nuevos antígenos. Por el contrario, el consumo crónico de etanol activa la respuesta inflamatoria, que puede ser lesiva, entre otros órganos, sobre el hígado.

Aparato cardiovascular

En los últimos años han sido publicados estudios que avalan los efectos beneficiosos del etanol sobre el desarrollo de cardiopatía isquémica y accidentes cerebrovasculares, siempre en relación con la ingesta de pequeñas cantidades ³². Sin embargo, el consumo crónico en cantidades consideradas de riesgo contribuye al desarrollo de hipertensión arterial y aumenta el riesgo de miocardiopatía y de insuficiencia cardiaca. Se han descrito, además, arritmias auriculares y ventriculares, sobre todo taquicardia paroxística o fibrilación auricular, tras una ingesta excesiva de etanol en personas sin signos previos de cardiopatía, síndrome conocido como *holiday heart* (“corazón de vacaciones”, o “del día de fiesta”).

Sistema endocrino y reproductivo

El alcohol produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa, acidosis láctica y trastornos del metabolismo del calcio, así como disminución de la secreción de hormonas tiroideas y de vasopresina, e incremento de las concentraciones de cortisol (seudosíndrome de Cushing). En varones produce atrofia testicular y descenso del recuento de espermatozoides. En la mujer puede producir amenorrea, esterilidad por disminución del tamaño ovárico y aborto espontáneo

El consumo excesivo de alcohol durante el embarazo puede dar lugar a abortos espontáneos, bajo peso al nacer, retraso del desarrollo y el denominado síndrome fetal por alcohol, un trastorno caracterizado por cambios en la fisionomía facial, dientes pequeños con defectos del esmalte, anomalías cardiacas con posible comunicación interauricular e interventricular, y microcefalia con retraso mental.

Aparato locomotor

Hasta el 50% de los alcohólicos crónicos muestran una disminución de la fuerza muscular esquelética, debido a miopatía alcohólica ³³. Asimismo, el consumo crónico de alcohol provoca cambios en el metabolismo del calcio, y estos enfermos tienen una menor densidad ósea, es más frecuente la osteoporosis y presentan un riesgo más elevado de fracturas.

NEUROBIOLOGÍA DEL ALCOHOL: MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ALCOHOL EN LAS DIFERENTES VÍAS DE NEUROTRANSMISIÓN

El etanol ejerce su efecto sobre el SNC mediante su unión a múltiples proteínas de la membrana neuronal a través de grupos hidrófobos, alterando su estructura tridimensional y función, así como actuando sobre transportadores, proteínasas y otras estructuras celulares. Por todo ello, el etanol es capaz de modificar la neurotransmisión en múltiples sistemas y circuitos cerebrales.

De forma resumida, el etanol potencia la acción del GABA, neurotransmisor inhibitorio, y antagoniza la acción del glutamato, neurotransmisor excitador. En consecuencia, a nivel cerebral, sus acciones generales son las de un depresor del SNC ³⁴, lo que explica los efectos sedantes inducidos por la ingesta de alcohol.

A continuación revisaremos brevemente la actuación del etanol sobre cada uno de los sistemas, y las repercusiones correspondientes.

Sistema gabaérgico

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia del SNC. Las neuronas que lo utilizan como neurotransmisor disminuyen de manera transitoria las respuestas de otras neuronas a estímulos posteriores. En concreto, el etanol potencia la acción del GABA, principalmente actuando sobre el receptor GABA A ³⁵. Este receptor está formado por cinco subunidades ensambladas entre sí formando un canal, a través del cual pueden pasar moléculas de muy pequeño tamaño, especialmente cloro. La activación del receptor asociado al canal determina la apertura de este último, permitiendo el paso de cloro y produciendo así una hiperpolarización de la membrana, lo que disminuye la excitabilidad de la neurona y, por tanto, su función.

El receptor GABA A presenta sitios de fijación específica para el GABA, las benzodiazepinas y los barbitúricos. El etanol no actúa directamente sobre estos sitios de unión, pero incrementa la apertura del canal determinada por sus agonistas. Esto explica que se potencien los efectos de esas sustancias con el consumo de alcohol.

La importancia del receptor GABA A en la dependencia alcohólica se ha comprobado en modelos animales y en estudios clínicos. Así, se sabe que un agonista GABA A, el TPI, produce autoadministración de etanol en ratas, mientras que su antagonista, el flumazenilo, la disminuye ³⁶. En humanos, el uso de sustancias que aumentan la transmisión gabaérgica, como las benzodiazepinas o los bloqueantes de la recaptación del GABA, forman parte de las terapias disponibles en el tratamiento de la abstinencia alcohólica ³⁷.

Aunque con menor relevancia, el receptor GABA B también se ha visto implicado en la dependencia alcohólica. Agonistas de este receptor son capaces de reducir la autoadministración de varias sustancias de abuso, entre ellas el etanol ³⁸.

En humanos, se ha utilizado el baclofén, fármaco agonista del receptor GABA B, en el tratamiento de la dependencia a drogas. Los datos disponibles indican que es un fármaco capaz de disminuir las propiedades reforzantes y motivacionales del alcohol, así como el *craving* o deseo de consumo en pacientes alcohólicos ³⁹.

Sistema glutamatérgico

El glutamato es, junto con el aspartato, el neurotransmisor excitador por excelencia del SNC. El etanol es capaz de ejercer su acción a través de tres tipos de receptores, denominados según la molécula agonista que los activa, y que están ampliamente distribuidos por el SNC ⁴⁰:

- Receptores NMDA (N-metil-D-aspartato): son los receptores glutamatérgicos más sensibles a la acción del etanol ⁴¹. Están asociados a un canal catiónico cuya activación produce un aumento de la permeabilidad para el sodio, el potasio y el calcio, lo que determina una despolarización de la membrana neuronal. La susceptibilidad del receptor a la acción del etanol varía según la composición de las unidades que lo forman, lo que confiere diferencias entre unos individuos y otros ⁴².
- Receptores AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico): a pesar de no ser tan relevantes como los receptores NMDA, determinados estudios han encontrado evidencias de la capacidad del etanol de inhibir, en animales de experimentación, la actividad glutamatérgica a través de la interacción con estos receptores en estructuras como la amígdala y el hipocampo ^{43,44}.
- Receptores de kainato: sus acciones están peor establecidas que las de los receptores NMDA o AMPA, pero parece que su inhibición en ciertas áreas cerebrales contribuiría también a los efectos sedantes del etanol ⁴⁵.

La acción antagónica del etanol sobre el receptor NMDA contribuye a los efectos del consumo de alcohol, como la tolerancia, la abstinencia, el deseo de consumo o las recaídas ⁴⁶. Como ejemplo de la participación de este sistema en la dependencia del alcohol, se ha comprobado que el acamprosato, que contribuye a la restauración de niveles normales del receptor NMDA en el sistema glutamatérgico, ha mostrado efectividad en el mantenimiento de la abstinencia.

Sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico actúa principalmente como modulador en el sistema de recompensa cerebral estimulado por el etanol y otras sustancias de abuso. En relación con este sistema, se conoce que el etanol aumenta la tasa de liberación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, que, a su vez, envía aferencias hacia la corteza frontal, y aumenta la concentración de dopamina en el núcleo *accumbens*⁴⁷, mediando de forma positiva en el reforzamiento y la recompensa.

La disfunción de la transmisión dopaminérgica se ha asociado con un incremento del deseo de consumo, y se relaciona con los síntomas de la abstinencia^{48,49}. Así, existen estudios que demuestran que la inyección local de antagonistas de la dopamina bloquea los efectos de recompensa del alcohol⁵⁰, y antagonistas de los receptores de dopamina, como la tiaprida, se usan con éxito para prevenir la agitación y las consecuencias físicas derivadas del síndrome de abstinencia, como las alucinaciones visuales del delirium tremens^{51,52}.

Sistema opioide

Juega un papel fundamental en la capacidad adictiva del etanol. Está constituido fundamentalmente por tres clases de receptores, μ , δ y κ , que interactúan con los péptidos opioides endógenos: endorfinas, dinorfinas y encefalinas⁵³.

El receptor opioide μ se distribuye ampliamente por el cerebro, expresándose en gran medida en el tálamo, y en los núcleos caudado, putamen y globo pálido⁵⁴. Presenta una alta afinidad por β -endorfinas, encefalinas y péptidos opioides exógenos, pero una baja afinidad por dinorfinas, que se unen preferentemente al receptor κ ⁵⁵. A él se une también el antagonista opioide por excelencia, la naltrexona.

El consumo de alcohol estimula la liberación de opioides endógenos, que al activar los receptores opioides μ en el área tegmental ventral contribuyen a las acciones reforzantes del etanol, potenciando la actividad de neuronas dopaminérgicas en terminales del sistema mesolímbico⁵⁶, y aumentando así la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens*⁵⁷. La administración de agonistas de receptores κ , por el contrario, inhibe la activación de neuronas dopaminérgicas. Diferencias individuales en la sensibilidad del sistema opioide endógeno pueden explicar, en parte, diferentes susceptibilidades interindividuales al deseo de consumo de alcohol y al desarrollo de dependencia alcohólica⁵⁸.

Estudios en animales de experimentación han puesto de manifiesto que los antagonistas opioides disminuyen el consumo de alcohol⁵⁹, y la naltrexona,

antagonista de los receptores opioides, puede producir una disminución de la frecuencia y cantidad de consumo en alcohólicos con dependencia del alcohol ⁶⁰.

El receptor opioide λ no se une con alta afinidad a ninguno de los opioides endógenos clásicos. Es una proteína transmembrana acoplada a proteínas G, que inhibe la adenilciclasa y la entrada de calcio a la célula, disminuyendo la formación de AMPc. Su péptido ligando endógeno, la nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ), inhibe las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, con un descenso en la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* ⁶¹, y disminuye la transmisión gabaérgica, bloqueando el incremento en la liberación de GABA inducido por etanol en la amígdala central ⁶². Estudios en animales de experimentación demuestran que el bloqueo del gen que codifica el receptor opioide λ se asocia con una reducción en la tolerancia a la morfina ⁶³, y que la activación del receptor λ reduce la autoadministración de etanol y previene la recaída, por lo que su activación farmacológica podría ser una alternativa a los antagonistas clásicos de los receptores opioides, como la naltrexona, en el tratamiento de la dependencia alcohólica ^{62, 64, 65}.

Sistema endocannabinoide

Han sido identificados dos subtipos de receptores cannabinoides, el CB1 y el CB2 ⁶⁶. El receptor CB1 está acoplado a proteínas-G, y se distribuye ampliamente en las estructuras cerebrales que participan en el sistema de recompensa, como el área tegmental ventral, el núcleo *accumbens*, el hipocampo o la corteza prefrontal ⁶⁷. El receptor CB2, en cambio, es un receptor cannabinoide periférico, distribuido de forma principal en el sistema inmune ⁶⁸.

El receptor CB1 interviene en la regulación de la liberación de neurotransmisores a nivel cerebral, tales como dopamina, GABA y glutamato. Así, la activación de los CB1 de neuronas gabaérgicas suprime la liberación de GABA, neurotransmisor inhibitorio, produciendo un incremento en la activación de las vías dopaminérgicas dirigidas hacia el núcleo *accumbens* ⁶⁹. También regula las proyecciones glutamatérgicas de la amígdala e hipocampo de forma indirecta, al inhibir la liberación de GABA, y las proyecciones gabaérgicas que van desde el núcleo *accumbens* al área tegmental ventral.

Numerosos datos experimentales apoyan la participación de este sistema en la dependencia al alcohol. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de antagonistas del CB1, como el rimonabant, suprime la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* producida por el etanol ⁷⁰, disminuye la autoadministración de alcohol en animales de experimentación, y la tasa de recaída en el consumo ^{71, 72}. Por otro lado, los agonistas del CB1 producen un aumento del consumo de etanol en

animales de experimentación y animales *knockout* para el *CNR1*, gen que codifica el receptor CB1, no presentan síntomas de síndrome de abstinencia con la supresión alcohólica ⁷³.

Sistema serotoninérgico

El etanol potencia la acción de la serotonina sobre los receptores 5-HT₃ y 5-HT₁ del sistema serotoninérgico, y aumenta los niveles extracelulares de serotonina en el núcleo *accumbens*, la corteza frontal y el hipocampo. El sistema serotoninérgico contribuye a la modulación del sistema de recompensa cerebral, de forma que alteraciones en este sistema pueden contribuir también al desarrollo de dependencia alcohólica ⁷⁴.

En estudios con animales de experimentación, el aumento de los niveles de serotonina propicia un descenso del consumo de alcohol ⁷⁵. El papel de fármacos serotoninérgicos, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, en el mantenimiento de la abstinencia alcohólica en humanos ha sido también estudiado, aunque los resultados han sido heterogéneos ⁷⁶.

Sistema colinérgico

El etanol actúa sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina situados en el área tegmental ventral, contribuyendo a la activación de las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico ⁵¹, y por tanto a las acciones reforzadoras del etanol. Según estos hallazgos, el bloqueo selectivo de estos receptores podría proporcionar una nueva herramienta en el tratamiento del alcoholismo ⁷⁷.

Además de la interacción con los sistemas citados hasta aquí, el etanol también actúa también sobre canales iónicos, en especial canales de calcio regulados por voltaje, impidiendo el flujo de iones Ca²⁺ hacia el citosol, y sobre segundos mensajeros como la proteína-quinasa C, y, por esa vía, potencia la producción de AMPc.

NEUROBIOLOGÍA DEL ALCOHOL: TOLERANCIA, ABSTINENCIA Y ACCIONES EN EL CIRCUITO DE RECOMPENSA CEREBRAL

En consonancia con los efectos del alcohol sobre los diferentes circuitos de neurotransmisión que se acaban de describir, el consumo crónico de alcohol induce diversas alteraciones bioquímicas a nivel cerebral, fundamentalmente en los receptores GABA y NMDA, y en los canales de calcio voltaje-dependientes:

a) Disminución del número de receptores GABA A y de la expresión de subunidades $\alpha 1$ ⁷⁸ a nivel de la corteza frontal y otras áreas cerebrales, a la vez que aumenta el número de subunidades $\alpha 6$. Además, se reduce la función gabaérgica por muerte neuronal en el giro dentado del hipocampo⁷⁹. Estos cambios producen una disminución de la capacidad inhibitoria del sistema gabaérgico.

b) Incremento del número de receptores NMDA glutamatérgicos⁸⁰, con lo que se potencia la neurotransmisión excitatoria.

c) Aumento del número de canales de calcio dependientes de voltaje, sobre todo los de tipo L, lo que se traduce en un mayor flujo intracelular de calcio.

Estos cambios son el origen de dos fenómenos fundamentales de la enfermedad alcohólica: la tolerancia al consumo continuado de alcohol, y el síndrome de abstinencia cuando cesa el mismo.

Tolerancia

La tolerancia puede definirse como la disminución de los efectos del alcohol tras la administración repetida del mismo. Se distinguen dos tipos:

a) Tolerancia farmacocinética: a igualdad de ingesta, los niveles sanguíneos de etanol serán menores, debido a que el propio etanol activa el sistema oxidativo microsomal que actúa metabolizándolo.

b) Tolerancia farmacodinámica: la misma concentración de etanol produciría efectos menores en el SNC del individuo alcohólico. Se desglosa en dos modalidades:

- Tolerancia conductual: cuando una tarea se realiza repetidamente bajo los efectos del alcohol se desarrolla mayor tolerancia a los efectos del mismo.

- Tolerancia celular o funcional: consiste en las adaptaciones celulares al consumo crónico de etanol; por ejemplo, cambios en el número de receptores o segundos mensajeros o en el número y sensibilidad de los canales transmembrana.

Abstinencia

La abstinencia traduce los efectos derivados de la ausencia brusca de etanol en un SNC que se ha adaptado al consumo crónico de la sustancia, mediante los cambios celulares explicados previamente. Consiste en fenómenos contrarios a los inducidos por la ingesta de alcohol, junto con sintomatología derivada de un aumento de actividad simpática, debido, entre otros mecanismos a un aumento de la liberación de noradrenalina en el *locus ceruleus*⁸¹.

Los cambios producidos a nivel del sistema gabaérgico, con una disminución de la función del mismo, son responsables, en parte, de las manifestaciones de hiperexcitabilidad neuronal características del síndrome de abstinencia, como

intranquilidad, nerviosismo, y, en casos graves, crisis convulsivas. Esto explica la disminución de las manifestaciones del síndrome de abstinencia alcohólica con el uso de sustancias que aumentan la actividad GABAérgica, como las benzodiazepinas o el clometiazol ⁷⁶, que son fármacos de primera elección en el tratamiento de la abstinencia.

El incremento de receptores NMDA determinado por el consumo crónico de alcohol provoca que, en ausencia de esta sustancia, se produzca una hiperfunción glutamatérgica responsable, junto con la hipoactividad gabaérgica, de la hiperexcitabilidad propia del síndrome de abstinencia. El acamprosato, que influye en la restauración a niveles normales de los receptores NMDA, puede ser, por tanto, un tratamiento efectivo en el mantenimiento de la abstinencia ⁸².

El sistema opioide endógeno también está implicado en la fisiopatología de la abstinencia alcohólica, dado que influye en el descenso de la actividad dopaminérgica que se produce durante la abstinencia ⁸³. Este hecho explica la utilidad terapéutica de los antagonistas opiáceos en el tratamiento del síndrome de abstinencia al alcohol. Así, la administración de naltrexona, antagonista de los receptores opioides μ reduce el consumo de etanol en pacientes alcohólicos ⁸⁴.

Por último, el incremento del número de canales de calcio, y como consecuencia, del flujo de calcio intracelular, propicia, en parte, manifestaciones del síndrome de abstinencia, tales como las convulsiones. De hecho, la administración de bloqueantes de los canales de calcio, como nimodipino, reduce en animales de experimentación y en humanos, los temblores, las convulsiones y la mortalidad inducida por la abstinencia etílica ⁸⁵.

Papel del etanol en el circuito de recompensa cerebral: propiedades reforzadoras

Un estímulo es reforzador si su aplicación aumenta las posibilidades de que vuelva a ser aplicado. En el caso de las sustancias adictivas, dado que es el individuo quien aplica el estímulo, la conducta queda reforzada por sus consecuencias; es lo que se denomina condicionamiento operante. Uno de los aspectos claves del etanol como droga de abuso es que es una sustancia con propiedades reforzadoras, dado que activa los circuitos cerebrales implicados en el mantenimiento de las conductas adictivas, llamados circuitos cerebrales de recompensa, por lo que puede crear dependencia.

Estas propiedades reforzadoras dependen en gran medida de la neurotransmisión dopaminérgica, a nivel sobre todo del sistema mesolímbico dopaminérgico, que ha sido denominado sistema dopaminérgico de recompensa ⁸⁶. El

FACTORES GENÉTICOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE ALCOHOLISMO

Al igual que en muchas otras enfermedades humanas, en el desarrollo de la adicción al alcohol intervienen factores genéticos y ambientales. Dentro de los ambientales, por ejemplo, es conocido que hay mayores tasas de alcoholismo entre los individuos que han crecido en un ambiente donde beber alcohol es tolerado y aceptado socialmente. Centrándonos en los factores genéticos, que es el objetivo de este trabajo, la historia familiar predice de forma importante el desarrollo de alcoholismo, de tal forma que los hijos de los pacientes alcohólicos presentan de tres a cinco veces más riesgo de desarrollar alcoholismo que la población general ⁸⁹. Estudios en gemelos y niños adoptados por familias con altas tasas de alcoholismo revelan que aproximadamente el 50-60 % de la variabilidad en el desarrollo de alcoholismo en la población se asocia con factores genéticos ⁵¹. Parámetros como la frecuencia de consumo, la cantidad de alcohol consumida en cada ocasión o incluso las concentraciones de alcohol en sangre y la tasa de eliminación en un determinado individuo, están también asociados con factores genéticos ⁹⁰. Dado que esta asociación también está presente en modelos animales, no es extraño que aspectos como la autoadministración de etanol, la sensibilidad a sus efectos o la gravedad del síndrome de abstinencia desarrollado con el cese de consumo, puedan modificarse mediante manipulación genética ^{91,92}.

El alcoholismo es una enfermedad poligénica, con intervención de múltiples genes, que interactúan entre ellos y con factores ambientales. Para intentar conocer los genes asociados con alcoholismo, se han realizado fundamentalmente dos tipos de estudios: rastreos hologenómicos (*genome-wide scan*) y estudios de asociación de genes candidatos. En los rastreos hologenómicos se analiza todo el material genético de los individuos afectados de dependencia alcohólica, para así poder identificar *locus* potencialmente asociados con una enfermedad. Por el contrario, en los estudios de asociación genética, se analiza la participación de genes concretos en el desarrollo de la dependencia alcohólica. Los genes estudiados en dichos trabajos pueden ser los identificados previamente en los rastreos hologenómicos, pero es habitual también seguir la estrategia denominada de *genes candidatos*. Para seleccionar dichos *genes candidatos* es preciso que cumplan dos características:

- Que estén potencialmente asociados con la susceptibilidad a desarrollar adicción a alcohol. Entre ellos, se incluyen, por ejemplo, todos aquellos genes cuyo producto interviene en el metabolismo o en las acciones del etanol sobre el organismo, de forma que alteraciones en su expresión podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad alcohólica.

- Que dichos genes posean variaciones en su secuencia de nucleótidos, lo que se conoce como polimorfismo. Un polimorfismo genético es una variante del ADN originado por una mutación puntual, que se ha transmitido a la descendencia, de forma que en la población general posee una frecuencia superior al 1%. El tipo más frecuente de polimorfismo es el denominado SNP (*single nucleotide polymorphism*), en el que la mutación afecta a un solo nucleótido de la secuencia de ADN. No todos los polimorfismos tienen la misma repercusión funcional, dado que algunos se encuentran en regiones codificantes del gen, cuyos cambios pueden traducirse en modificaciones en la función de la proteína o en la expresión génica, mientras que otros están en la región promotora o en la región 3'UTR. Sin embargo, resulta difícil considerar algunas mutaciones como no funcionales de forma definitiva, dado que recientes investigaciones han demostrado la importancia de polimorfismos localizados en regiones previamente consideradas no funcionales⁹³.

De forma genérica, los estudios de polimorfismos relacionados con una determinada enfermedad pueden realizarse desde dos enfoques: los estudios familiares de asociación, que examinan patrones de herencia, y los estudios de casos y controles, que comparan las frecuencias genotípicas de determinados polimorfismos en individuos con la enfermedad no relacionados entre sí, y controles sanos. Los estudios familiares son, en líneas generales, el enfoque preferido, pero para que su realización sea factible deben reunirse varias circunstancias: el componente genético de la enfermedad debe ser relativamente fuerte, la enfermedad debe ser relativamente fácil de diagnosticar, tanto por las técnicas o criterios que precise para ello, como por la accesibilidad de los casos, y se deben poder obtener muestras de ADN de los familiares que se incluirán en el estudio. Debido a la dificultad de reunir todas estas premisas, la mayoría de los estudios genéticos de asociación se basan en un diseño de casos y controles, en los que se intenta establecer si los casos, es decir, los individuos que presentan ese determinado rasgo, presentan la variante genómica estudiada en mayor proporción que los controles, individuos que se sabe que están libres de la enfermedad⁹⁴.

Es importante tener en cuenta varias consideraciones cuando se lleva a cabo un estudio genético de asociación con un diseño de casos y controles, para evitar tanto que no sean identificadas asociaciones reales, es decir, falsos negativos, como que asociaciones debidas al azar se tomen como verdaderas, lo que se denominarían falsos positivos. Por ello, al diseñar el estudio, es importante tener en cuenta algunas premisas:

a) La elección de los genes candidatos y los polimorfismos para estudio debe basarse en la relevancia del gen elegido en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, es más plausible *a priori* estudiar los polimorfismos que resultan en el cambio de un aminoácido en el producto proteico del gen, que los polimorfismos situados en regiones no codificantes, porque con mayor probabilidad supondrán un cambio real en la función de la proteína y, por tanto, en la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, existen muchos estudios de mutaciones silentes, es decir, aquellas que no alteran la secuencia de aminoácidos, o mutaciones en intrones no codificantes, que son capaces de modificar la expresión genética, regulando el inicio de la transcripción, o alterando el ARN mensajero. De hecho, el descubrimiento paulatino de la importancia de las regiones del genoma que anteriormente se creían silentes refuerza la posible importancia de polimorfismos en dichas regiones.

b) La elección de la muestra objeto de estudio debe realizarse de forma cuidadosa, evitando sesgos, y el número de individuos incluidos debe ser suficiente para conseguir la potencia estadística necesaria para detectar diferencias reales. De hecho, una de las claves para determinar la validez externa de un estudio de asociación es el tamaño muestral. Por otro lado, para conseguir una adecuada caracterización de los casos y los controles, los criterios diagnósticos de la enfermedad deben ser uniformes y estar debidamente aplicados en toda la muestra. Las poblaciones deben ser lo más homogéneas posibles y es importante que tanto casos como controles presenten el mismo origen étnico. Las diferencias alélicas entre los grupos étnicos pueden hacer que si la frecuencia es muy baja el estudio no tenga suficiente poder para detectar una asociación. Algo similar puede suceder si es importante en el desarrollo de la enfermedad la interacción genes-medio ambiente, en un grupo étnico no expuesto. Diferencias en factores biológicos podrían explicar la dificultad para replicar los hallazgos en los estudios de asociación ⁹⁴. Asimismo, se deben excluir aquellos casos y controles con fenotipos en cuya fisiopatología intervengan los genes a estudio, lo cual es particularmente importante en los estudios de dependencia alcohólica. En este sentido, se deberían excluir los pacientes con dependencia a otras sustancias de abuso, ya que comparten circuitos cerebrales con la dependencia al alcohol. De igual manera, se deberían excluir también los pacientes con otros trastornos mentales como la esquizofrenia o trastornos del estado de ánimo, en los que existen estudios que demuestran la implicación de los mismos genes en su fisiopatología.

c) Aspectos estadísticos del diseño del estudio: la frecuencia de la variante genética que va a ser estudiada determina el número de casos y controles que necesitarán ser seleccionados para el estudio, para conseguir así el poder estadístico

suficiente para detectar una diferencia en la frecuencia entre los dos grupos. Un aspecto controvertido en este tipo de estudios es la aplicación de una corrección por múltiples tests para establecer el nivel de significación estadística, dado el riesgo de que las asociaciones encontradas se deban al azar. Sin embargo, hay riesgo de que aplicando las correcciones por múltiples tests se pierdan asociaciones auténticas⁹⁵ por lo que la probabilidad de que una asociación observada se deba al azar debe ser considerada a la luz de la plausibilidad biológica de dicha asociación, más que únicamente en función del *P*-valor obtenido.

Existen multitud de polimorfismos genéticos localizados en los genes que codifican las diferentes proteínas de los sistemas implicados en la neurobiología del alcoholismo, y que por tanto pueden estar potencialmente implicados en la enfermedad alcohólica. Pueden ser divididos en dos grupos: los implicados en el metabolismo del etanol, ya que el tiempo de permanencia del alcohol en el organismo influye en la vulnerabilidad al alcoholismo, y los relacionados con los efectos funcionales y orgánicos producidos por el etanol en el organismo.

Una revisión completa y exhaustiva de todos los estudios de asociación entre diferentes polimorfismos genéticos y la presencia de alcoholismo excede al objetivo de este trabajo; por ello, esta introducción se centra en los estudios de asociación realizados previamente sobre el sistema opioide y cannabinoide, con especial énfasis en los genes y polimorfismos que hemos estudiado en este trabajo.

POLIMORFISMOS DEL SISTEMA OPIOIDE

El sistema opioide juega un papel fundamental en la fisiopatología de la dependencia al alcohol y otras drogas⁹⁶ mediante la modulación del sistema de recompensa cerebral. De esta forma, polimorfismos genéticos en los genes que codifican los diferentes receptores de este sistema podrían explicar las diferencias en cuanto a la susceptibilidad a las propiedades reforzadoras del etanol.

Receptor opioide μ

El receptor opioide μ humano (MOR, del inglés *μ -opioid receptor*), es el responsable de muchas de las acciones de los opioides, como la euforia, la analgesia, y la abstinencia a opiáceos⁹⁷. Este receptor MOR es codificado por el gen *OPRM1*, que se localiza en 6q24-q25 y han sido identificadas más de 300 variantes genéticas del *OPRM1*^{98, 99}. La repercusión funcional de algunas de estas alteraciones no es

conocida, bien sea porque no la tengan o porque no haya sido descrita aún. En todo caso, ratones *knockout* del gen *OPRM1* carecen de analgesia inducida por morfina, incluso en presencia de receptores δ y κ intactos ¹⁰⁰.

Determinadas sustancias no opioides, como la cocaína y el alcohol, interaccionan con el sistema opioide mediante este receptor, estimulando el sistema mesolímbico dopaminérgico y la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens*. También aumentan los niveles cerebrales de β -endorfinas, las cuales activan a su vez el MOR para provocar sensación de recompensa ¹⁰¹. La administración de etanol por sí solo, o en combinación con cocaína, aumenta los niveles de MOR en el cerebro de animales de experimentación ¹⁰². La naltrexona, uno de los fármacos usados en el tratamiento de la dependencia alcohólica, ejerce su efecto fundamental a través del bloqueo del MOR ¹⁰³.

Existen multitud de trabajos que estudian la relación entre los múltiples polimorfismos del *OPRM1* con la dependencia a sustancias. Uno de los SNP del *OPRM1* más analizados es el que se localiza en la posición 118 del exón 1 (rs1799971, A118G), que produce la sustitución de asparragina por ácido aspártico en la posición 40 de la cadena de aminoácidos (Asn40Asp) ¹⁰⁴. Esta mutación es relativamente importante, dado que la frecuencia poblacional del alelo Asp40 es de alrededor del 10-15% en caucásicos y que, respecto a su repercusión funcional, varios estudios señalan que el receptor MOR con la variante Asp40 presenta una afinidad por las β -endorfinas hasta tres veces mayor que la variante Asn40 ¹⁰⁵. Sin embargo otros estudios muestran que este cambio no tiene consecuencias en distintas líneas celulares ^{104, 106}. En el estudio de Zhang y cols., publicado en 2005, dicha variante se asociaba con una reducción de la expresión del receptor ¹⁰⁷.

Debido a todas estas características, este polimorfismo ha sido estudiado ampliamente en relación con dependencia a sustancias y, en particular, con el alcoholismo. Los resultados han sido controvertidos, y un metanálisis publicado por Arias y cols. en 2006 ¹⁰⁸ concluye que no existe asociación entre este SNP y la dependencia a sustancias. Analiza 28 estudios en diferentes poblaciones, de los cuales cuatro de ellos muestran una mayor proporción del alelo Asp40 en los sujetos dependientes de heroína y/o alcohol, o en aquellos con patrón de ingesta de grandes cantidades de estas sustancias ¹⁰⁹⁻¹¹². Por el contrario, otros tres estudios mostraban una proporción mucho más elevada del alelo Asp40 en los controles ^{105, 113, 114}. El resto de estudios analizados no mostró resultados significativos ^{104, 115-125}.

Además del papel del polimorfismo Asn40Asp en la predisposición a la dependencia a sustancias, se ha estudiado también su implicación en la respuesta al

tratamiento deshabitador con antagonistas opiáceos. Los pacientes con el alelo Asp40 presentan mejor respuesta al tratamiento con naltrexona en algunos estudios con determinados grupos poblacionales ¹²⁶⁻¹²⁸, mientras que en otros estudios no se han reproducido estos resultados ^{129, 130}. Un metanálisis de 6 estudios publicado recientemente concluye que los pacientes portadores del alelo Asp40 tratados con naltrexona presentaban tasas de recaída más bajas ¹³¹. Además de la relación con naltrexona, Arias y cols. ¹³² estudiaron esta relación con el nalmefene, antagonista opiáceo comercializado en EEUU, sin encontrar relación entre 5 SNP de los genes de receptores opiáceos *OPRM1*, *OPRD1* y *OPRK1* y una mayor respuesta al tratamiento.

Finalmente, también se ha estudiado la asociación de este polimorfismo con la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario al consumo de alcohol. Dado que la exposición crónica al etanol disminuye la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario a los estímulos externos, se ha postulado que el deseo de consumo es inversamente proporcional a los niveles de cortisol, por lo que una escasa respuesta de cortisol al estrés se ha relacionado con un aumento del consumo de alcohol. En algunos estudios los portadores del alelo Asp40 presentaban una baja respuesta del cortisol al estrés, mayor toma de alcohol y mayor deseo de consumo en estas situaciones ¹³³ aunque las diferencias no fueron significativas.

Otro polimorfismo estudiado ampliamente es el C17T, localizado en la posición 17 del exón 1 del gen *OPRM1*, en el que una sustitución de C por T conlleva un cambio del aminoácido alanina por valina. Un estudio mostró un aumento de la frecuencia del alelo C en sujetos con dependencia alcohólica ¹³⁴; sin embargo, otros no han referido dicha asociación ^{104, 114, 115, 117, 122}. Un estudio publicado recientemente por Crystal y cols. relaciona el genotipo TT con el aumento de la frecuencia y la cantidad de consumo de cocaína, alcohol y tabaco en mujeres americanas de origen africano, sin demostrar esta asociación con el consumo de opiáceos ¹³⁵.

Otros polimorfismos en teoría menos relevantes también han sido estudiados. Así, Kranzler y cols. encontraron una asociación entre la repetición de dinucleótidos CA en el intrón 1 y la dependencia a alcohol y otras drogas ¹³⁶. Los SNP Ser147Cys e Ile292Val, localizados en los exones 2 y 3 respectivamente, se han tratado de relacionar con la dependencia a alcohol y opiáceos en poblaciones de diferentes etnias, sin una clara evidencia de asociación ^{104, 124}.

Además de estudios de asociación de genes individuales, se han realizado también diversos estudios de haplotipos, que tampoco han arrojado resultados consistentes ^{115, 118, 122}. Hoehe y cols. en el 2000 ¹¹⁸ y Luo y cols. en el 2003 ¹²² señalaron una débil asociación entre haplotipos de polimorfismos localizados en la región reguladora de la transcripción 5'-UTR, y la dependencia a diferentes sustancias,

como el etanol, heroína y cocaína. Por otra parte, Zhang y cols. examinaron en 2006 la relación de 13 SNP, varios de ellos situados en regiones intrónicas del gen, en una población de norteamericanos de ascendencia europea y con dependencia al alcohol y/o otras drogas (cocaína y opiáceos). Los 13 SNP se distribuyeron en dos bloques haplotípicos. En el bloque 1 se encontró asociación significativa entre el polimorfismo rs3823010 A/G y la dependencia a cocaína y opiáceos, y entre el rs495491 C/T y la dependencia a alcohol, cocaína y opiáceos. En el bloque 2 se encontró asociación entre los polimorfismos rs609148 C/T y rs648893 C/T y la dependencia alcohólica⁵⁵.

Todos estos hallazgos sugieren que variantes genéticas en diversas regiones del gen *OPRM1* pueden jugar un papel en la susceptibilidad a la dependencia a sustancias.

Receptor opioide δ

El receptor opioide δ modula, junto con el resto de receptores del sistema opioide, la sensación de recompensa, tolerancia y dependencia asociadas con los opioides, y está también involucrado en las propiedades reforzantes de otras drogas no opioides, como el alcohol o la cocaína. Está codificado por el gen *OPRD1*, localizado en 1p36.1-p34. Incrementos de su expresión pueden aumentar los efectos de recompensa de las sustancias de abuso, a través de una mayor liberación de dopamina en el núcleo *accumbens*, aumentando así la vulnerabilidad a la dependencia de sustancias.

Diversos estudios realizados tanto en animales de experimentación como en humanos, han demostrado la importancia del receptor opioide δ en los procesos adictivos. Por ejemplo, ratones *knock-out* para este gen pierden la tolerancia a la morfina¹³⁷. Estudios en pacientes dependientes de drogas han demostrado que variantes identificadas en la secuencia del gen *OPRD1* son capaces de cambiar la funcionalidad del receptor y tener un papel en la adicción a las mismas.

En un trabajo realizado por Zhang y cols. en 2010¹³⁸ se demostró que la presencia del alelo menor G del polimorfismo rs569356, variante identificada en la región promotora del *OPRD1*, incrementaba la expresión génica y estaba presente en mayor proporción de forma significativa en una muestra de sujetos con dependencia a opiáceos. En otros estudios, como los de Levran y cols.¹³⁹ o de Nelson y cols.¹⁴⁰, sí se obtuvo una asociación entre la presencia de varios SNP del gen *OPRD1* y la dependencia a sustancias de abuso.

El polimorfismo rs2234918, T921C, ha sido objeto de estudio en varios trabajos con resultados dispares. Mientras que Mayer y cols.¹⁴¹ describieron en 1997 una

asociación significativa del mismo con la dependencia a heroína en individuos caucásicos, otros estudios no han corroborado esa asociación ^{139, 142, 143}, y también han sido negativos los resultados de análisis realizados en otras poblaciones ¹⁴⁴. Este polimorfismo también ha sido estudiado previamente en relación con la dependencia alcohólica, y los resultados disponibles han sido negativos ^{125, 142, 143}.

El polimorfismo rs1042114, T80G, también ha sido valorado en relación con la adicción a sustancias de abuso. Loh y cols. ¹²⁵ no hallaron relación con la dependencia alcohólica en una población de individuos taiwaneses, y Zhang y cols. en 2008 ¹⁴² tampoco encontraron una asociación entre la presencia aislada de este polimorfismo en una población de norteamericanos con ascendencia europea y la dependencia alcohólica. Sin embargo, sí describen una asociación entre la presencia del alelo G y la dependencia a opioides, así como una relación significativa con la dependencia a alcohol, cocaína y opiáceos de un haplotipo que contiene el alelo G del rs1042114 y el alelo C del rs2234918.

El polimorfismo rs4654327 ha sido estudiado previamente en relación con la dependencia a opioides, con resultados negativos ¹³⁹, y el rs678849 fue objeto de estudio por Zhang y cols. ¹⁴², sin que estos autores demostraran asociación con la dependencia a alcohol ni opioides.

Receptor opioide λ

Este receptor presenta una amplia distribución por el SNC, especialmente en núcleos olfatorios, corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, medula espinal y retina. Su activación puede producir tanto hiperalgesia y alodinia como analgesia por bloqueo del sistema opioide, dependiendo de la dosis y vía de administración. En animales de experimentación, se ha demostrado una elevada expresión del receptor en áreas implicadas en la recompensa, la motivación y el aprendizaje ¹⁴⁵. Está codificado por el gen *OPRL1*, que se encuentra en la región q13.2-13.2 del cromosoma 20 y contiene cinco exones. Su péptido ligando endógeno, la nociceptina es procesado a partir de un precursor, la prepronociceptina, codificada por el gen *PNOC*. A su vez, *PNOC* contiene cuatro exones y está localizado en el cromosoma 8p21.

Estudios realizados en animales han demostrado que la interacción entre la nociceptina y su correspondiente receptor a nivel de los circuitos neuronales implicados en el reforzamiento del etanol condiciona un freno en su consumo ⁶² por lo que la activación farmacológica del receptor de la nociceptina podría suponer una alternativa al bloqueo clásico de los receptores opioides para el tratamiento del alcoholismo ⁶⁵.

Aunque los estudios que tratan de relacionar las variantes genéticas del gen *OPRL1* con la adicción en humanos son escasos, algunos estudios han establecido una asociación entre determinados polimorfismos y la dependencia al alcohol y otras sustancias de abuso, y asimismo los análisis de haplotipos apoyan también este hecho. Así, en el trabajo de Xuei y cols.¹⁴⁶, que incluía 10 SNP del gen *OPRL1* y 15 de *PNOG*, se encontró una asociación de los polimorfismos rs17058952 y rs351779 del gen *PNOG* y la dependencia alcohólica, con una débil significación estadística. Posteriormente, Huang y cols. publicaron¹⁴⁷ un trabajo en población escandinava en el que se incluían 15 SNP del *OPRL1*. Sus resultados muestran una asociación entre el rs6010718 y la dependencia alcohólica, siendo negativo el estudio para el resto de los polimorfismos evaluados. Sin embargo, en el análisis de haplotipos, estos mismos autores señalan una asociación significativa con la dependencia alcohólica. Finalmente, Briant y cols.¹⁴⁸ estudiaron la posible relación entre la presencia de 5 SNP del gen *OPRL1* con la dependencia a opioides, observando una relación de los polimorfismos rs6090041 y rs6090043, ambos localizados en el intrón 1, con la dependencia a opioides en el subgrupo de etnia caucásica, pero sin encontrar esta asociación en norteamericanos de origen africano o hispano.

Receptor opioide κ

El receptor opioide κ (KOR) está codificado por el gen *OPRK1*, localizado en el cromosoma 8q11.2, compuesto por cuatro exones y tres intrones. La activación del KOR a través de su ligando endógeno, la dinorfina, disminuye tanto la liberación basal de dopamina como la inducida por drogas¹⁴⁹, y puede prevenir el desarrollo del refuerzo producido por el sistema de recompensa cerebral, generando estados aversivos. De esta forma, la administración de agonistas de KOR en animales de experimentación reduce la toma voluntaria de alcohol¹⁵⁰, mientras que los antagonistas producen el efecto opuesto¹⁵¹. Puede tener un papel también en las manifestaciones del síndrome de abstinencia, dado que existen estudios que señalan que la administración de antagonistas del KOR a animales de experimentación aumenta la gravedad de los síntomas de abstinencia, mientras que la administración de agonistas disminuye los mismos¹⁵².

Múltiples estudios, tanto de análisis del *OPRK1* como del *PDYN*, gen que codifica la prodinorfina -precursor del ligando endógeno del KOR, la dinorfina- han demostrado una relación entre polimorfismos en sus secuencias y el riesgo de dependencia a sustancias. Así, Edenberg y cols. en 2008¹⁵³ describieron que un

complejo inserción-delección de la región 5' del *OPRK1* se asociaba con una reducción de la actividad promotora del gen, y a su vez, con un aumento del riesgo de alcoholismo. Yuferov y cols. en 2004 ¹⁴⁹ encontraron una asociación entre el SNP rs1051660 (C36T) y la dependencia a opioides, hallazgo similar al de Gerra y cols. en 2007 ¹⁵⁴. Por otra parte, Zhang y cols. ¹⁴² publicaron en 2008 un estudio en el que un haplotipo compuesto por 7 SNP del gen *OPRK1* se asociaba con la dependencia alcohólica en una muestra de norteamericanos, y Xuei y cols. ¹⁵⁵ publicaron en 2006 un estudio en 1860 individuos norteamericanos dependientes de alcohol, en el que varios SNP localizados en secuencias no codificantes del gen, concretamente en el intrón 2, se asociaban de forma significativa con la dependencia alcohólica; estos autores no encontraron, sin embargo, asociación con la dependencia al estudiar varios SNP de regiones codificantes del gen, entre ellos el rs1051660.

En otros trabajos tampoco se han encontrado asociaciones significativas entre diversos polimorfismos del gen *OPRK1* y la dependencia a sustancias. Así, por ejemplo, Loh y cols. en 2004 ¹²⁵ estudiaron polimorfismos del *OPRK1* en individuos taiwaneses dependientes de alcohol, sin encontrar asociación significativa en ninguno de ellos. El estudio de Luo y cols. en 2008 ¹⁵⁶ tampoco mostró resultados significativos en el estudio de SNP ni en el análisis de haplotipos en una muestra de individuos con adicción a múltiples sustancias. Levran y cols. ¹³⁹ tampoco pudieron relacionar el polimorfismo rs6473797 con la dependencia a opioides, y el reciente trabajo de Kumar y cols., publicado en 2012 ¹⁵⁷ en población de origen india no ha demostrado que polimorfismos en regiones codificantes del *OPRK1* influyeran en la adicción a alcohol o heroína.

POLIMORFISMOS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Como se indicó anteriormente, al considerar la neurobiología del etanol, el sistema cannabinoide endógeno participa de forma importante no sólo en los procesos de refuerzo, sino también en la vulnerabilidad individual, adquisición del comportamiento de autoadministración de alcohol, desarrollo de tolerancia/dependencia/abstinencia de alcohol, así como en la recaída al alcohol.

El gen *CNR1*, que codifica el receptor CB1, se localiza en la región cromosómica 6q14-q15 ¹⁵⁸ y en este gen se han identificado cuatro exones que dan origen, al menos, a cinco moléculas distintas de ARN mensajero. Se han descrito 11 SNP en la secuencia del *CNR1* y un microsatélite en la región 3'UTR ¹⁵⁹, que consiste en repeticiones del triplete AAT ¹⁶⁰. Este triplete está localizado en la región no

traducida del gen y Comings y cols.¹⁶¹ encontraron en una muestra de pacientes caucásicos una asociación significativa entre el genotipo de alelos largos ($\geq 5/\geq 5$) de este polimorfismo con diferentes tipos de dependencia a sustancias, pero no con el abuso o dependencia de alcohol. Johnson y cols., por su parte, detectaron también una asociación entre las alteraciones en el número de repeticiones del triplete AAT y el abuso de sustancias¹⁶². Otros estudios, sin embargo, no han mostrado resultados significativos al respecto¹⁶³⁻¹⁶⁵.

Resultados contradictorios también han sido comunicados con respecto a los SNP del *CNR1*. Schmidt y cols.¹⁶⁶ estudiaron el polimorfismo rs1049353 (G1359A) en una muestra de pacientes alcohólicos y controles no alcohólicos, y encontraron una mayor frecuencia del alelo A en los sujetos alcohólicos, y del genotipo AA en pacientes con delirium como manifestación del síndrome de abstinencia alcohólica. Sin embargo, otros estudios no mostraron asociación de esta mutación con la dependencia al alcohol^{167, 168} o a otras sustancias de abuso¹⁶⁵.

Por su parte, Zuo y cols.¹⁶⁷ encontraron en norteamericanos con ascendencia europea una asociación significativa entre la presencia del alelo mutado G del polimorfismo rs6454674 y la dependencia a diversas sustancias de abuso, hallazgo no replicado posteriormente^{165, 169}. El polimorfismo rs806368 también ha sido objeto de estudio en distintas poblaciones^{159, 167} en relación con la dependencia a sustancias adictivas. Señalar por último las conclusiones de un reciente metanálisis¹⁷⁰ que analizaba los resultados descritos hasta el momento de tres polimorfismos del *CNR1*, el rs1049353, el rs806379 y la repetición del triplete de bases AAT, y solo encontraba evidencia de un pequeño efecto del último polimorfismo en la susceptibilidad a la dependencia a drogas ilícitas.

Entre los estudios de haplotipos, cabe señalar el realizado por Zhang y cols.¹⁵⁹, quienes señalaron la asociación entre el haplotipo TAG (correspondiente a los alelos T, A y G de los SNP rs806379, rs535255 y rs2023239, en este orden) del gen *CNR1* y la dependencia a sustancias en una muestra de pacientes norteamericanos con ascendencia europea y africana, y en japoneses.

Otros trabajos publicados más recientemente señalan también la relación entre las diferentes variantes genéticas del *CNR1* y la dependencia a sustancias; por ejemplo, el estudio de Zuo y cols.¹⁷¹, que describe la asociación de diferentes SNP del *CNR1* con la dependencia al alcohol y otras drogas como la cocaína.

OBJETIVOS

Como se ha señalado en la introducción de este trabajo, es conocido que los factores genéticos desempeñan un papel esencial en el desarrollo de dependencia alcohólica. Sin embargo, y a pesar de los múltiples estudios llevados a cabo hasta el momento, la implicación de determinadas mutaciones genéticas en los sistemas que participan en la neurobiología del alcoholismo sigue siendo una incógnita.

El **objetivo general** de nuestro trabajo fue, por tanto, verificar si los individuos poseedores de determinadas mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales en la neurobiología del alcoholismo presentaban una mayor incidencia de dependencia del alcohol, en comparación con individuos con abuso de esta sustancia, pero sin dependencia, y con voluntarios sanos.

Con este fin establecimos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar en una muestra de la población española de pacientes con dependencia de alcohol o con abuso de alcohol, según criterios DSM-IV, así como en controles sanos, los siguientes polimorfismos de genes que codifican proteínas implicadas en la neurobiología del alcohol:

a. Polimorfismos del sistema opioide:

- Polimorfismo rs1799971 del gen *OPRM1*
- Polimorfismo rs2075572 del gen *OPRM1*
- Polimorfismo rs540825 del gen *OPRM1*
- Polimorfismo rs1042114 del gen *OPRD1*
- Polimorfismo rs2234918 del gen *OPRD1*
- Polimorfismo rs4654327 del gen *OPRD1*
- Polimorfismo rs678849 del gen *OPRD1*
- Polimorfismo rs2229205 del gen *OPRL1*
- Polimorfismo rs351779 del gen *PNOC*
- Polimorfismo rs17058952 del gen *PNOC*
- Polimorfismo rs702764 del gen *OPRK1*
- Polimorfismo rs1051660 del gen *OPRK1*
- Polimorfismo rs963549 del gen *OPRK1*

b. Polimorfismos del sistema cannabinoide:

- Polimorfismo rs1049353 del gen *CNR1*
- Polimorfismo rs6454674 del gen *CNR1*

- Polimorfismo rs806368 del gen *CNR1*

2. Comparar nuestros resultados con los obtenidos en estudios previos sobre variables genéticas de dichos sistemas de neurotransmisión en pacientes con abuso y dependencia al alcohol.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES

Realizamos un estudio de casos y controles, en el que se incluyeron como casos a 300 pacientes que referían un consumo de más de 100 g de alcohol/día durante un periodo de tiempo de, al menos, 10 años, procedentes en su mayoría de la Unidad de Alcoholismo del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Salamanca o de la planta de hospitalización de dicho Servicio, y en algunos casos del hospital Virgen de la Concha de Zamora. De ellos, 113 cumplían criterios de abuso de alcohol y 187 presentaban dependencia al consumo de alcohol, ambos trastornos definidos según la clasificación DSM-IV ¹⁵.

El grupo control estaba formado por 157 voluntarios sanos, con un consumo inferior a 10 g de etanol/día, sin antecedentes psiquiátricos ni relacionados con el alcoholismo, tanto a nivel personal como familiar. Todos los pacientes y controles eran de origen caucásico y originarios de la comunidad autónoma de Castilla y León, así como sus ascendientes hasta el segundo grado. Ninguno de los individuos incluidos en el estudio presentaba consumo activo de otras drogas, a excepción de nicotina.

En el momento de la inclusión en el estudio, se llevó a cabo la extracción de una muestra de 10 cc de sangre periférica, previo consentimiento informado, para su posterior procesamiento en el laboratorio, de acuerdo con las regulaciones legales para Estudios Clínicos en España, y la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

EXTRACCIÓN DEL ADN

Obtención de células mononucleadas de sangre periférica

Se utilizaron muestras de sangre periférica recogida en tubos de EDTA, en las cuales se aislaron las células nucleadas mediante centrifugación durante 15 min a 1500 rpm a 4 ° de temperatura. Tras este proceso, se consiguió la aparición de tres fases: la correspondiente al plasma, la interfase que contiene las células nucleadas de la sangre, y la fase eritrocitaria.

Se recuperó la interfase de células nucleadas, y tras la lisis de los glóbulos rojos que hubieran podido arrastrarse con agua destilada en una nueva centrifugación, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0,25 M Sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH: 7,5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂) el cual proporciona la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Posteriormente se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 min.

Aislamiento del ADN total de alto peso molecular

El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5×10^6 células/mL, con la adición de EDTA 0,5 M pH 8 (concentración final 10 mM), quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; SDS (concentración final 1%), para romper las membranas celulares; y proteinasa K (concentración final 50 $\mu\text{g/mL}$), para degradar las proteínas. La mezcla resultante se incubó en baño a 55 °C durante 8-16 h.

Purificación del ADN

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del ADN. Para ello se añadió al producto obtenido un volumen igual al suyo de la mezcla: fenol+cloroformo+alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló y centrifugó durante 10 min a 1800 rpm a 20 °C, y se recoge la fase sobrenadante que contiene el ADN en solución. A esta fase se le añadió un volumen de CIAA (cloroformo + alcohol isoamílico 24:1), y se centrifugó de nuevo con las mismas condiciones que en el paso previo. Se recuperó de nuevo la fase acuosa, y se introdujo en un tubo con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclándose por inversión hasta que apareció ADN, ya que el etanol absoluto hace que precipite. Se retiró y mezcló en un tubo Eppendorf con 500 μl de etanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se decantó. Por último, se lavó el ADN mediante la adición de etanol al 70% y una nueva centrifugación, y finalmente se resuspendió en ddH₂O estéril.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Esta técnica se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia, y presenta la ventaja de que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior¹⁷². Además, durante el proceso de amplificación se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en todo momento, ya que es proporcional a la emisión de fluorescencia producida en la reacción, pudiendo así registrarse la cinética del proceso¹⁷³.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados para llevar a cabo la discriminación alélica de los polimorfismos fueron las sondas *TaqMan MGB*[®] (*Applied Biosystems*). Se trata de oligonucleótidos que hibridan específicamente, marcados con

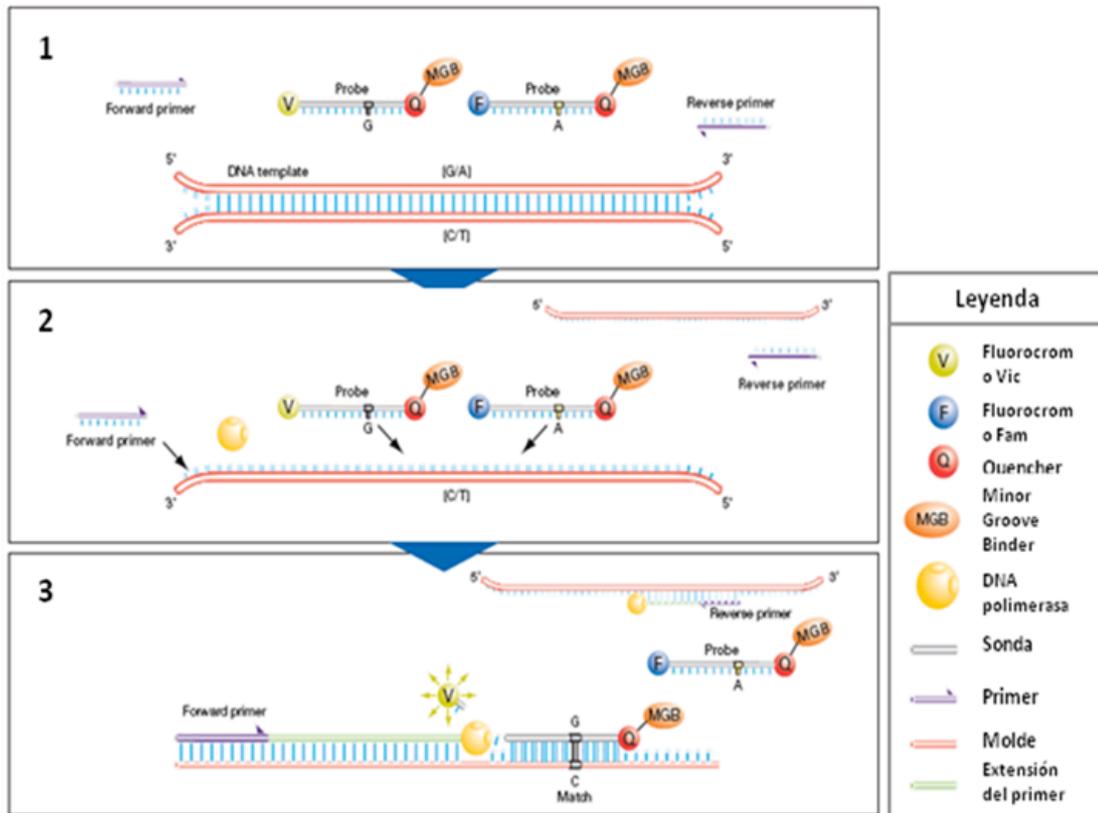
un fluorocromo donador en el extremo 5' y un aceptor en el extremo 3'. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia, conocida por las siglas FRET (del inglés *fluorescence resonance energy transfer*) entre las dos moléculas. El fluorocromo donador, al absorber energía, pasa al estado excitado, y al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia, mientras que el aceptor o *quencher* absorbe esa fluorescencia y la disipa en forma de calor. Para que esto ocurra, ambos fluorocromos deben estar espacialmente próximos, y el espectro de emisión del donador se ha de solapar con el espectro de absorción del *quencher*.

Mientras la sonda está intacta y los fluorocromos están cercanos, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación del ADN, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. La ADN polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, y al toparse con la sonda, mediante su actividad 5'exonucleasa, la hidroliza, liberando el fluorocromo donador. Al producirse la separación de los fluorocromos, la fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector (figura 3). En este estudio, los fluorocromos usados para la discriminación alélica fueron VIC y FAM, con un espectro de excitación de 528 nm y 492 nm, y de emisión de 546 y 515 nm respectivamente.

Los equipos para llevar a cabo la PCR a tiempo real están compuestos por un termociclador y un lector de fluorescencia. Pueden efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales estudiados en ese momento, y en cualquier momento de la reacción. En nuestro estudio se usó el equipo *StepOnePlus*[®] (*Applied Biosystems*[®]), que dispone de varios canales de lectura, lo que permite utilizar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos en una misma reacción, para el estudio de genes diferentes.

Las condiciones experimentales fueron las mismas para el estudio de todos los polimorfismos, a excepción de las sondas específicas utilizadas en cada uno de ellos. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 10 µL, que contenía 5 µL del compuesto comercial *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix No AmpErase*[®] *UNG*, 0,25 µL de la sonda específica para el polimorfismo estudiado, 4,25 µL de agua estéril y 0,5 µL del DNA.

Figura 3. Mecanismo de la PCR con sondas *TaqMan*



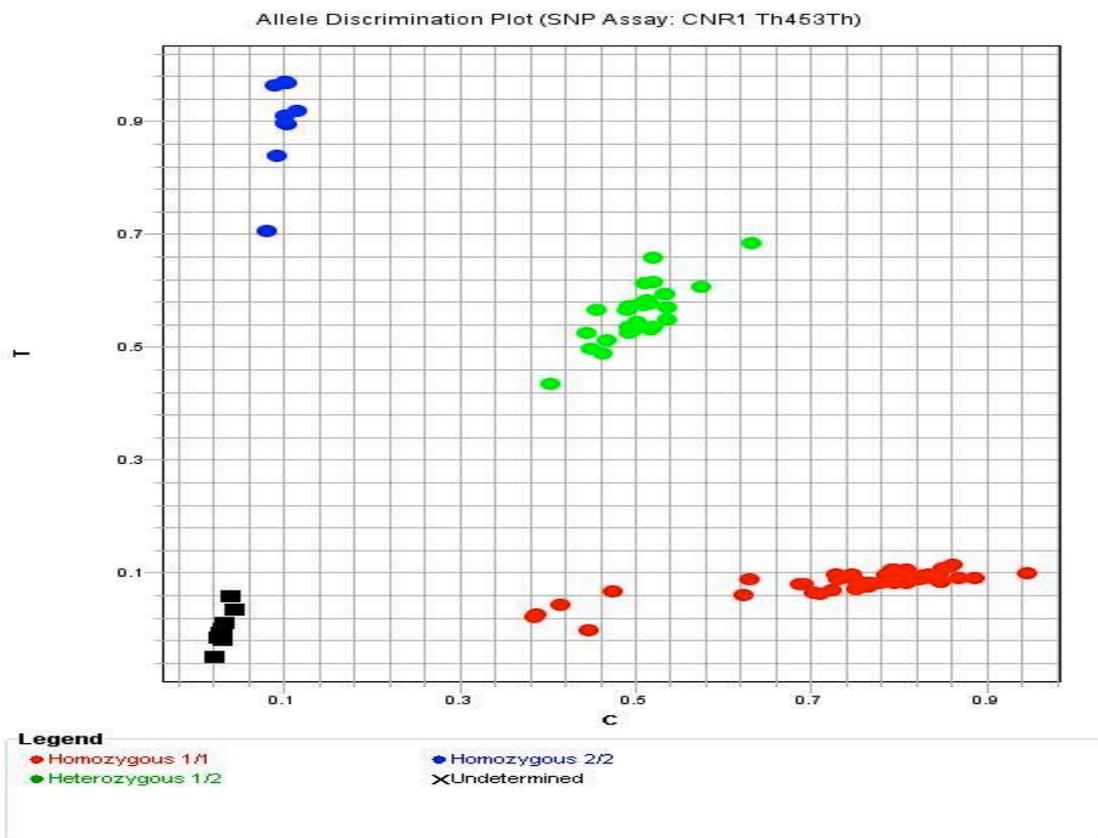
1. Componentes de la reacción, 2. Desnaturalización del DNA molde y alineamiento de los componentes de la reacción, 3. Polimerización y generación de la señal

Las condiciones empleadas en el termociclador en cada uno de los pasos se muestran a continuación:

- A:** tramo de pre-PCR: 60 °C; 30 segundos
- B:** desnaturalización inicial: 95 °C; 10 minutos
- C:** desnaturalización: 95 °C; 15 segundos.
- D:** anillamiento y elongación: 60 °C; 1 minuto
- E:** elongación final, 60 °C; 30 segundos.

Para cada uno de los polimorfismos estudiados se obtiene una gráfica, como la mostrada en la figura 4, que permite la discriminación alélica de cada uno de los pacientes incluidos en el experimento.

Figura 4. Representación gráfica de los resultados obtenidos en el estudio de un polimorfismo mediante PCR con sondas *Taqman*



POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

Los polimorfismos analizados en este estudio se han nombrado de acuerdo al número de identificación (rs#) del polimorfismo en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology*, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), y además, cuando estaba disponible, por su denominación habitual en la literatura, basada en la posición de la variante alélica en el gen, con respecto al punto de inicio de la transcripción.

Gen del receptor opioide μ (*OPRM1*)

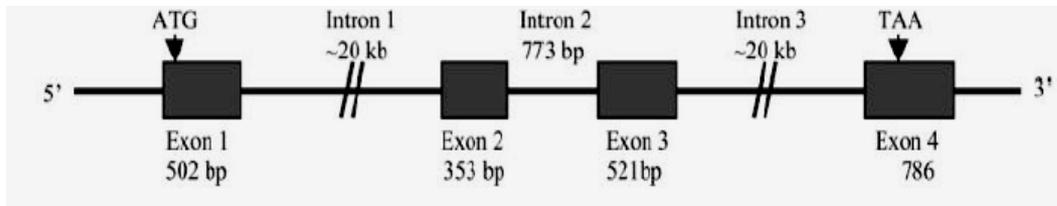
Se han estudiado tres polimorfismos en este gen:

Polimorfismo rs1799971 (A118G)

Está localizado en el exón 1 del gen *OPRM1* (figura 5), y consiste en un cambio del nucleótido A por G en la posición +118. Este cambio se traduce en

la sustitución del aminoácido asparragina (Asn) por aspartato (Asp) en la posición 40 de la proteína.

Figura 5. Estructura del *OPRM1* (Modificado de Zhang et al., 2006) ⁵⁵



Polimorfismo rs2075572 (C691G)

Este polimorfismo, localizado en el intrón 2 del gen *OPRM1*, supone la sustitución del nucleótido C por G en la posición 691.

Polimorfismo rs540825

Se sitúa en el exón final de la secuencia del gen *OPRM1*. Consiste en la sustitución del nucleótido A por T, lo que provoca el cambio de histidina por glutamina en la posición 402 de la secuencia de aminoácidos, que corresponde al dominio intracelular del receptor.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 5. En las figuras 6 y 7 se muestra un ejemplo de las gráficas de discriminación alélica obtenidas en el estudio de los polimorfismos de este gen.

Tabla 5. Secuencias de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación de los polimorfismos del gen *OPRM1*

Polimorfismo rs1799971
Referencia: C_8950074_1
Secuencia de las sondas VIC/FAM:
VIC: GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGC [A] ACCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAA
FAM: GTCAACTTGTCCCACTTAGATGGC [G] CCTGTCCGACCCATGCGGTCCGAA
Polimorfismo rs2075572
Referencia: C_1691815_1
Secuencia de las sondas VIC/FAM:
VIC: GTTAGCTCTGGTCAAGGCTAAAAAT [C] AATGAGCAAATGGCAGTATTAACA
FAM: GTTAGCTCTGGTCAAGGCTAAAAAT[G] AATGAGCAAATGGCAGTATTAACA
Polimorfismo rs540825
Referencia: C_1691811_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: CCCTGTCTTGCTGGGCTCTAGAGCA [A] GCTGCTTGTTGTGTACCCTGGAC
FAM: CCCTGTCTTGCTGGGCTCTAGAGCA [T]GCTGCTTGTTGTGTACCCTGGAC

Figura 6: Discriminación alélica del polimorfismo rs2075572 en un grupo de pacientes y controles

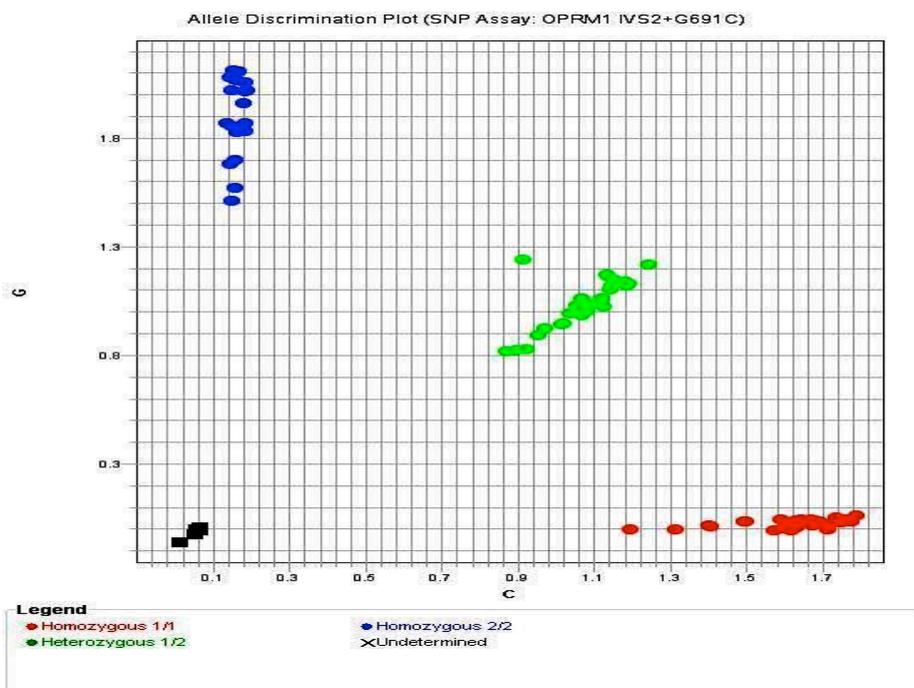
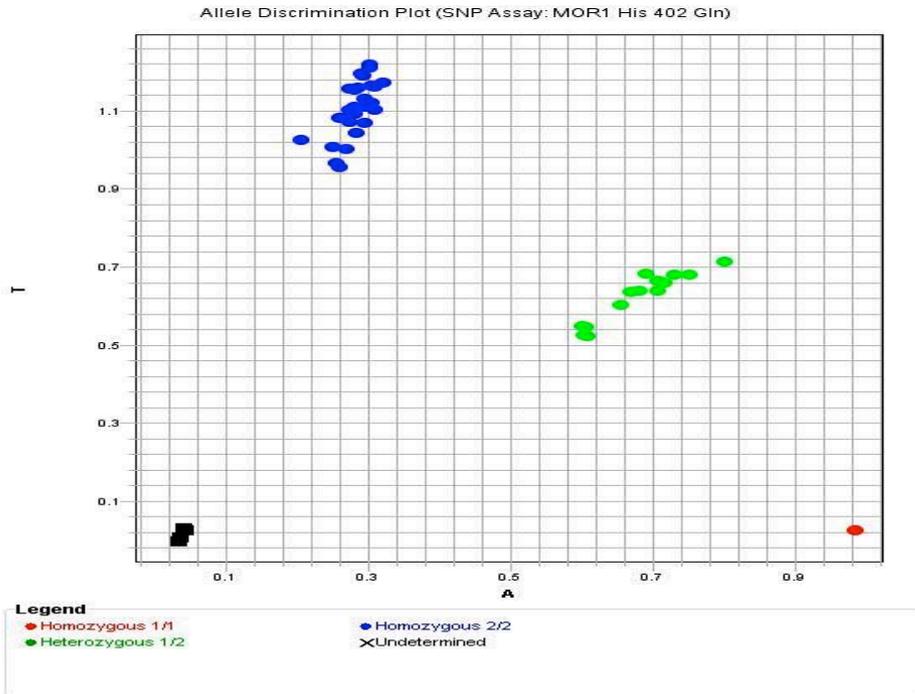


Figura 7. Discriminación alélica del polimorfismo rs540825 en un grupo de pacientes y controles



Gen del receptor opioide δ (*OPRD1*):

Se han estudiado cuatro polimorfismos de este gen (figura 8).

Polimorfismo rs1042114 (T80G)

Se localiza en el primer exón del gen *OPRD1*. Se produce un cambio de G por T en la posición +80, en la segunda base del codón 27. Esta sustitución se traduce en un cambio del aminoácido cisteína por fenilalanina en la posición 27 de la proteína (*Cys27Phe27*).

Figura 8. Estructura del gen *OPRD1* (modificado de Zhang et al., 2010)¹³⁸



Polimorfismo rs2234918 (T921C)

Localizado en el tercer exón del gen *OPRD1*, da lugar a un cambio de C por T en la posición 921 de la proteína, lo que no modifica la cadena de aminoácidos. Es, por tanto, una mutación silente.

Polimorfismo rs4654327

Se produce una sustitución del nucleótido A por G en la región 3'UTR del gen *OPRD1*.

Polimorfismo rs678849

Consiste en una sustitución de C por T en el intrón 1 del gen.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación de los polimorfismos del gen *OPRD1*

Polimorfismo rs1042114
Referencia: C_8861910_30
Secuencia de las sondas VIC y FAM
VIC: GCCTCGGACGCCTACCCTAGCGCCT [G] CCCAGCGCTGGCGCCAATGCGTCG
FAM: GCCTCGGACGCCTACCCTAGCGCCT [T] CCCAGCGCTGGCGCCAATGCGTCG
Polimorfismo rs2234918
Referencia: C_2962149_20
Secuencia de las sondas VIC y FAM.
VIC: CGCTGCACCTGTGCATCGCGCTGGG [C] TACGCCAATAGCAGCCTCAACCCCG
FAM: CGCTGCACCTGTGCATCGCGCTGGG [T] TACGCCAATAGCAGCCTCAACCCCG
Polimorfismo rs4654327
Referencia: C_2962150_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: TTAAACAGGGCATCTCCAGGAAGGC [A] GGGCTTCAACCTTGAGACAGCTTCG
FAM: TTAAACAGGGCATCTCCAGGAAGGC [G] GGGCTTCAACCTTGAGACAGCTTCG
Polimorfismo rs678849
Referencia: C_11264519_1
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: GTCCTTCTTACCATAGTGTCAAAAG [C] ACCTGCTAGGTGCTGAGCTTGGCTG
FAM: GTCCTTCTTACCATAGTGTCAAAAG [T] ACCTGCTAGGTGCTGAGCTTGGCTG

En las figuras 9 y 10 se muestran sendos ejemplos de las gráficas de discriminación alélica obtenidas en el estudio de dos de los polimorfismos estudiados del gen *OPRD1*.

Figura 9. Discriminación alélica del polimorfismo rs4654327 en una muestra de pacientes y controles

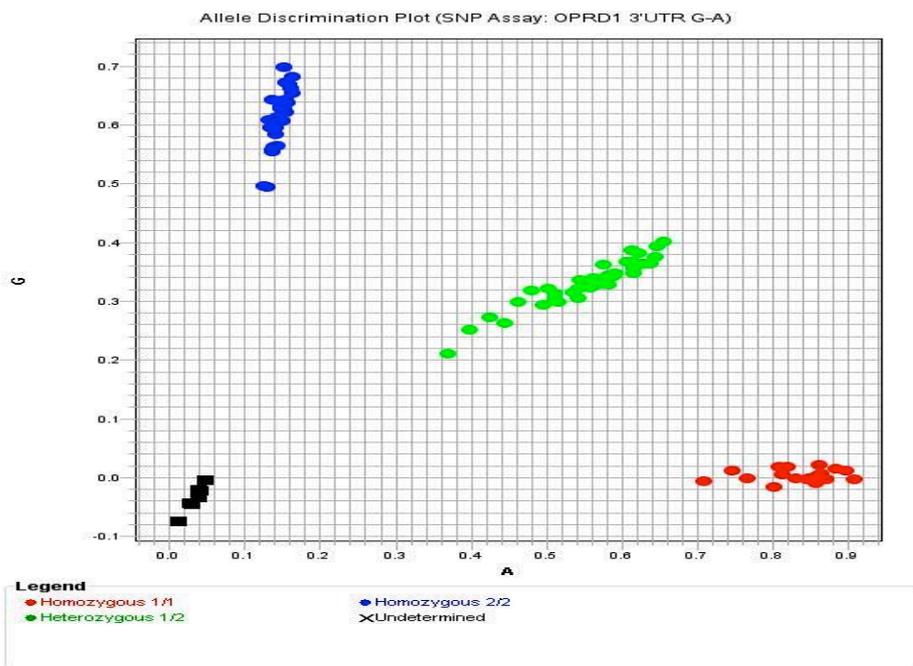
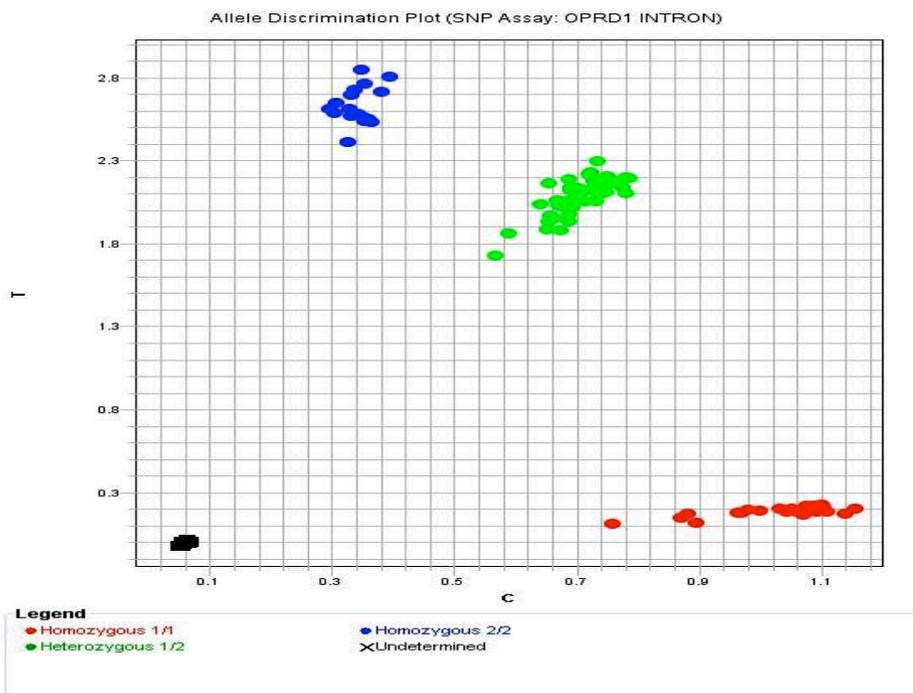


Figura 10. Discriminación alélica del polimorfismo rs678849 en una muestra de pacientes y controles

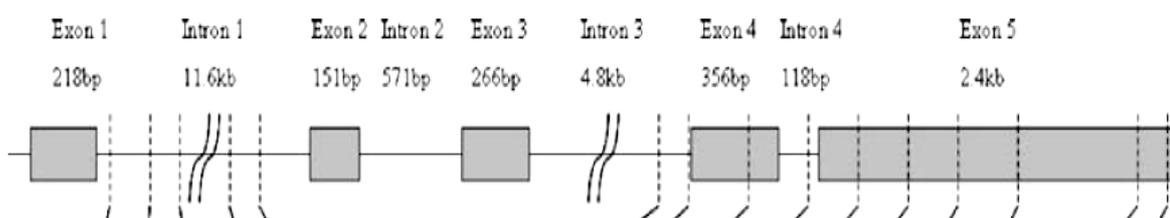


Gen del receptor opioide λ (*OPRL1*)

Polimorfismo rs2229205

Se localiza en el exón 4 del gen *OPRL1* (figura 11). En este polimorfismo se produce la sustitución del nucleótido C por T, lo que no conlleva un cambio de aminoácidos en la proteína, por lo que es una mutación silenciosa.

Figura 11. Estructura del gen *OPRL1* (Modificado de Huang et al., 2008) ¹⁴⁷

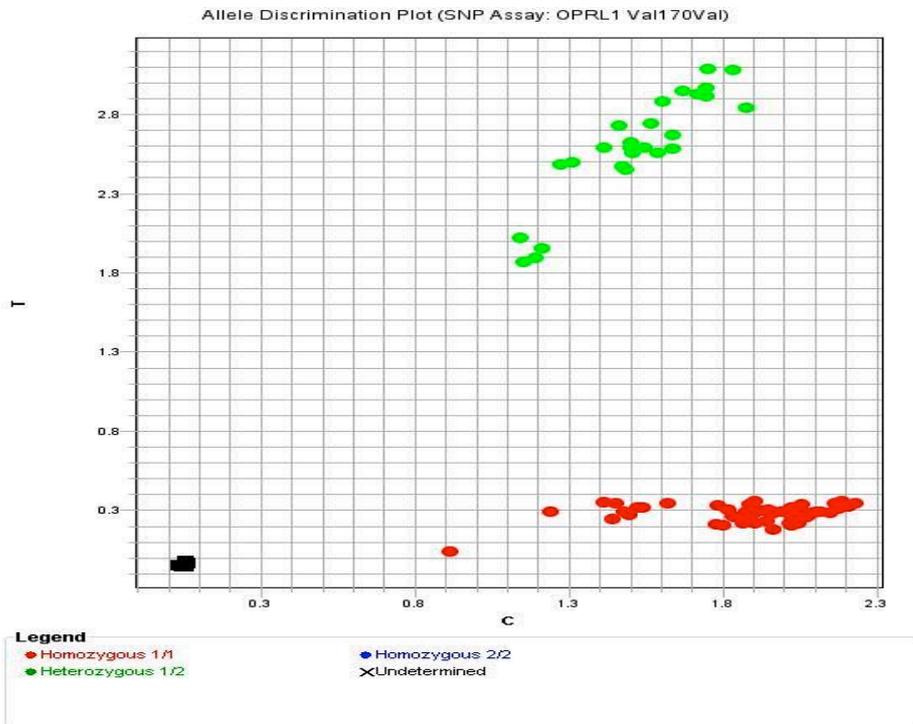


En la tabla 7 se muestran las sondas usadas en la determinación de este polimorfismo, y en la figura 12 se muestra un ejemplo de gráfica de discriminación alélica de este polimorfismo en un grupo de pacientes y controles de la muestra estudiada.

Tabla 7. Secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación del polimorfismo del gen *OPRL1*

Polimorfismo rs2229205
Referencia: C_16190064
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: CACGTCCAGCAAAGCCCAGGCTGT[C]AATGTGGCCATCTGGGCCCTGGCCT
FAM: CACGTCCAGCAAAGCCCAGGCTGT[T]AATGTGGCCATCTGGGCCCTGGCCT

Figura 12. Discriminación alélica del polimorfismo rs2229205 en una muestra de pacientes y controles



Gen de la pronociceptina (*PNOC*)

Se han estudiado dos polimorfismos pertenecientes a este gen.

Polimorfismo rs351779

Sustitución de A por G en la región 3' UTR del gen.

Polimorfismo rs17058952

Sustitución de A por G en la posición -295, localizada en la región promotora 5'UTR.

En la tabla 8 se exponen las secuencias de las sondas empleadas en la determinación de este polimorfismo, y en las figuras 13 y 14 se muestran ejemplos de discriminación alélica obtenida en el estudio de los polimorfismos del gen *PNOC*.

Tabla 8. Secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación de los polimorfismos del gen *PNOC*

Polimorfismo rs351779
Referencia: C_1140720_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: GCCCTCCTGAGCGAAGTTCCCATGT [A] TCAAGAACGTGCCCTCCCCTCCCCA
FAM: GCCCTCCTGAGCGAAGTTCCCATGT [G] TCAAGAACGTGCCCTCCCCTCCCCA
Polimorfismo rs17058952
Referencia: C_32587924_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: CAGCCCTGGGCTCCTCCGAGTCGGT [A] GGAGCTTGGCATGAGCTCCCCTCCC
FAM: CAGCCCTGGGCTCCTCCGAGTCGGT [G] GGAGCTTGGCATGAGCTCCCCTCCC

Figura 13. Discriminación alélicas del polimorfismo rs351779 en una muestra de pacientes y controles

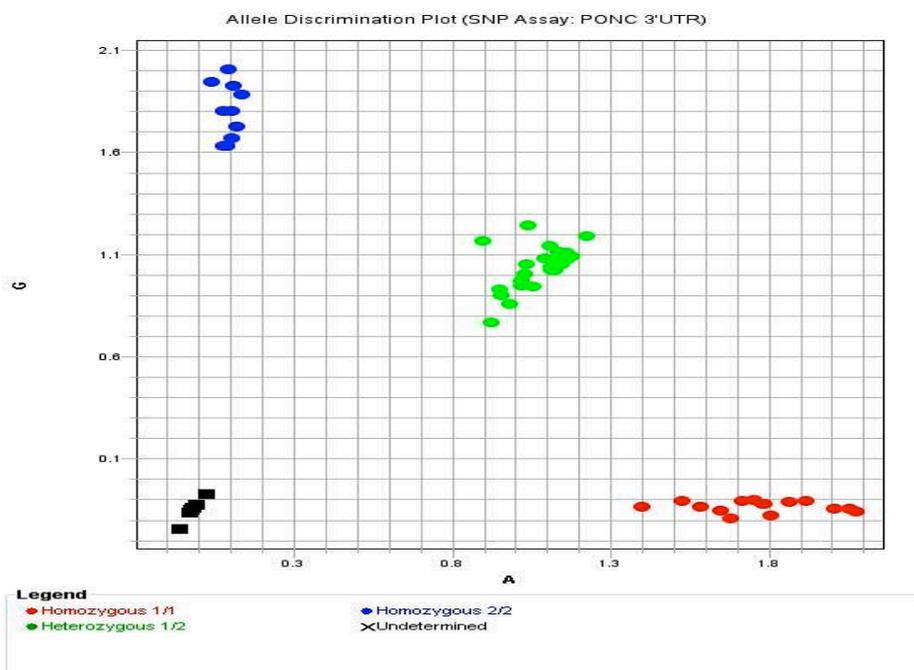
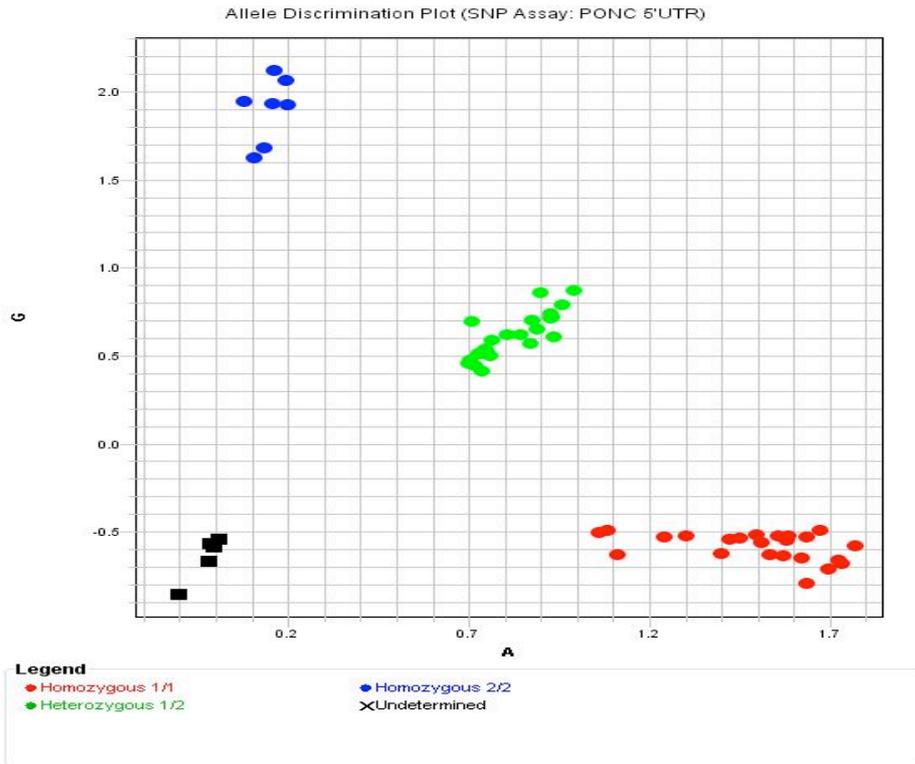


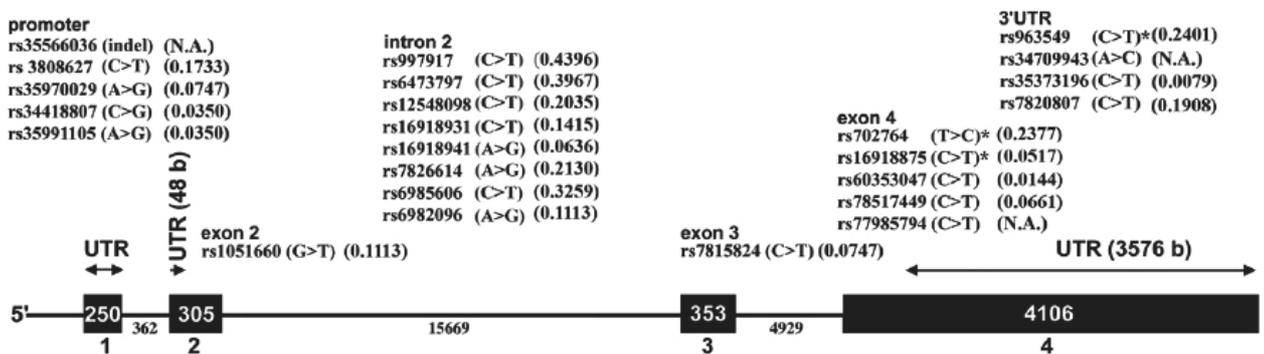
Figura 14. Discriminación alélica del polimorfismo rs17058952 en una muestra de pacientes y controles



Gen del receptor opioide κ (*OPRK1*)

En este gen se han estudiado tres polimorfismos. La estructura del gen y la localización de los tres polimorfismos se muestra en la figura 15.

Figura 15. Estructura del gen *OPRK1* (modificado de Kumar et al., 2012)¹⁵⁷



Polimorfismo rs702764 (T843C)

Localizado en el exón 4 del gen, consiste en la sustitución del nucleótido C por T en la posición 843, lo que provoca una mutación silente.

Polimorfismo rs1051660 (C36T)

Este polimorfismo, situado en el exón 2 del gen *OPRK1*, supone la sustitución de A por C en la posición 36. Provoca una mutación silente en la proteína, es decir, no se produce un cambio en la cadena de aminoácidos.

Polimorfismo rs963549

Consiste en la sustitución del nucleótido C por T en la región 3'UTR del gen.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 9. Las figuras 16 y 17 son sendos ejemplos de la discriminación alélica obtenida en el estudio de los polimorfismos del gen *OPRK1*.

Tabla 9. Secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación de los polimorfismos del gen *OPRK1*

Polimorfismo rs702764
Referencia: C_7480505_10 Secuencia de las sondas VIC y FAM. VIC: TGGGAGTCCAGCAGACGACGAAGAC [C] GCCACCACCACCAGGACCAGTCTGG FAM: TGGGAGTCCAGCAGACGACGAAGAC [T] GCCACCACCACCAGGACCAGTCTGG
Polimorfismo rs1051660
Referencia: C_7480519_10 Secuencia de las sondas VIC y FAM: VIC: AGGCGCTCGGGGCGCAGGTAGGGCC [A] GGCTCCCCGCGGAAGATCTGGATCG FAM:AGGCGCTCGGGGCGCAGGTAGGGCC[C] GGCTCCCCGCGGAAGATCTGGATCG
Polimorfismo rs963549
Referencia: C_7480504_20 Secuencia de las sondas VIC y FAM VIC: CTAGATCATTGAACTCCTCTCTTCC [C] GAAGAACTGTACGAAGACATCTCCA FAM: CTAGATCATTGAACTCCTCTCTTCC [T] GAAGAACTGTACGAAGACATCTCCA

Figura 16. Discriminación alélica del polimorfismo rs1051660 en una muestra de pacientes y controles

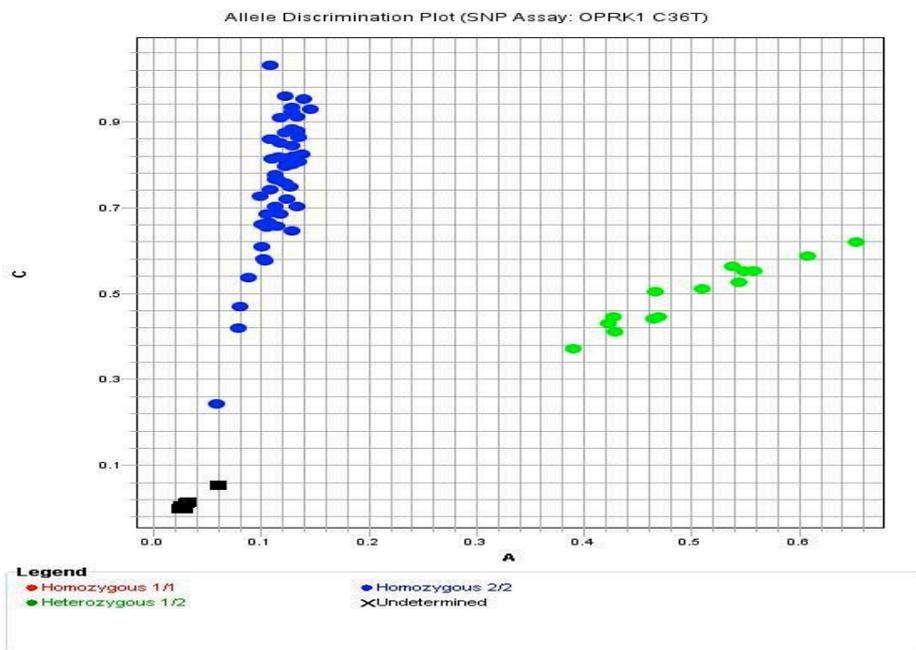
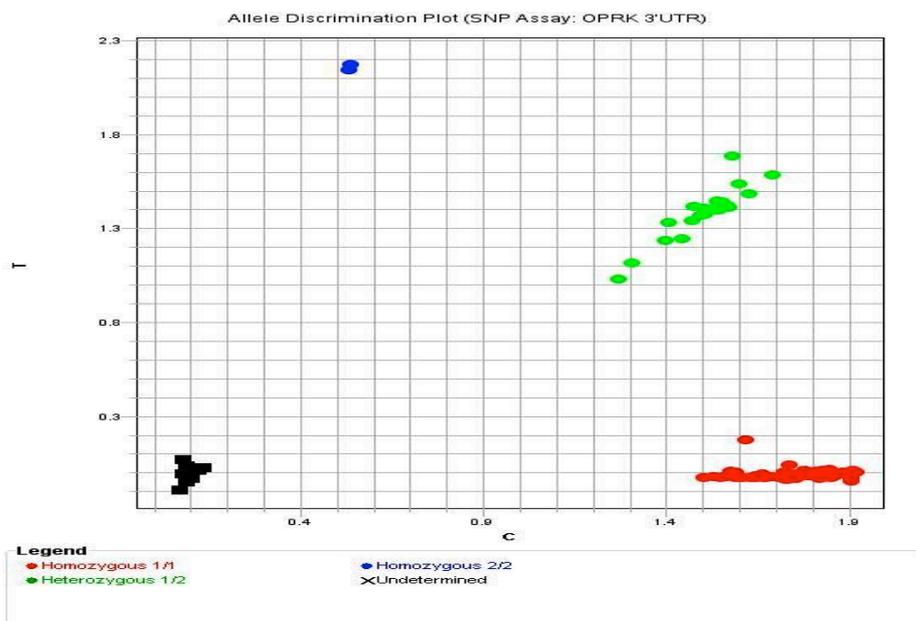


Figura 17. Discriminación alélica del polimorfismo rs963549 en una muestra de pacientes y controles



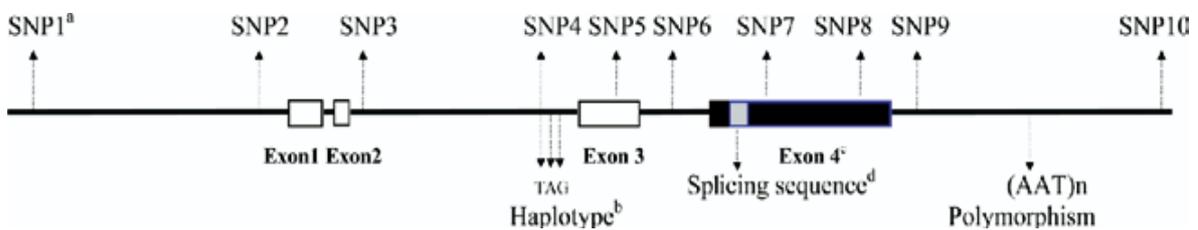
Gen del receptor cannabinoide (*CNR1*)

Hemos estudiado tres polimorfismos pertenecientes a este gen (figura 18).

Polimorfismo rs1049353 (C1359T)

Localizado en el exón 4, supone la sustitución del nucleótido C por T en la posición 1359, dando lugar a una mutación silente en el aminoácido treonina, en la posición 453 de la proteína.

Figura 18. Estructura del gen *CNR1* (Modificado de Zuo et al., 2007)¹⁶⁷



Polimorfismo rs6454674

Localizado en la posición -17937 del intrón 2 del gen, supone la sustitución de timina por guanina.

Polimorfismo rs806368

Localizado en la posición 4894 del exón 4, e implica la sustitución de adenina por guanina.

En la tabla 10 se muestra la secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en este polimorfismo. Las figuras 19, 20 y 21 ejemplifican la discriminación alélica obtenida en el estudio de polimorfismos en un grupo de pacientes y controles.

Tabla 10. Secuencia de las sondas VIC y FAM usadas en la determinación de los polimorfismos del gen *CNR1*

Polimorfismo rs1049353
Referencia: C_1652590_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: ACATGGTTACCTTGGCAATCTTGAC [C] GTGCTCTTGATGCAGCTTTCTGCGG
FAM: ACATGGTTACCTTGGCAATCTTGAC [T] GTGCTCTTGATGCAGCTTTCTGCGG
Polimorfismo Rs6454674
Referencia: C_11418433_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: TCCTGGAATAAAAGAAGCAATAACT [G] TCACCCAGAATTCTTATAAATTCAA
FAM: TCCTGGAATAAAAGAAGCAATAACT [T] TCACCCAGAATTCTTATAAATTCAA
Polimorfismo Rs806368
Referencia: C_8943804_10
Secuencia de las sondas VIC y FAM:
VIC: ACGGCAATGTAAAGAACTCTCCCA [C] CCGAAAATTACTGATTTGTAGGCCA
FAM: ACGGCAATGTAAAGAACTCTCCCA [T] CCGAAAATTACTGATTTGTAGGCCA

Figura 19. Discriminación alélica del polimorfismo rs6454674 en una muestra de pacientes y controles

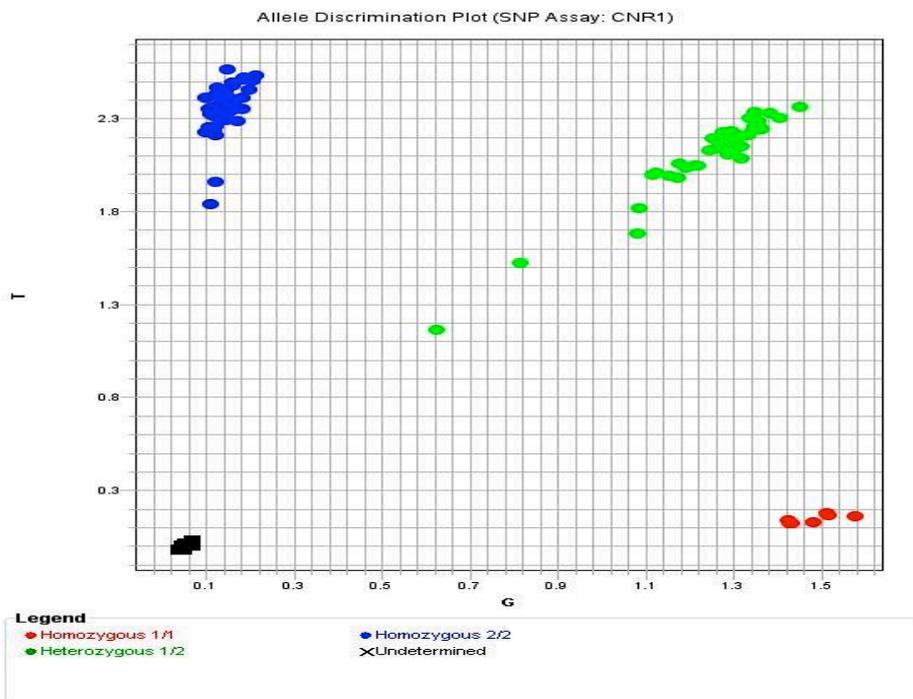


Figura 20. Discriminación alélica del polimorfismo rs1049353 en una muestra de pacientes y controles

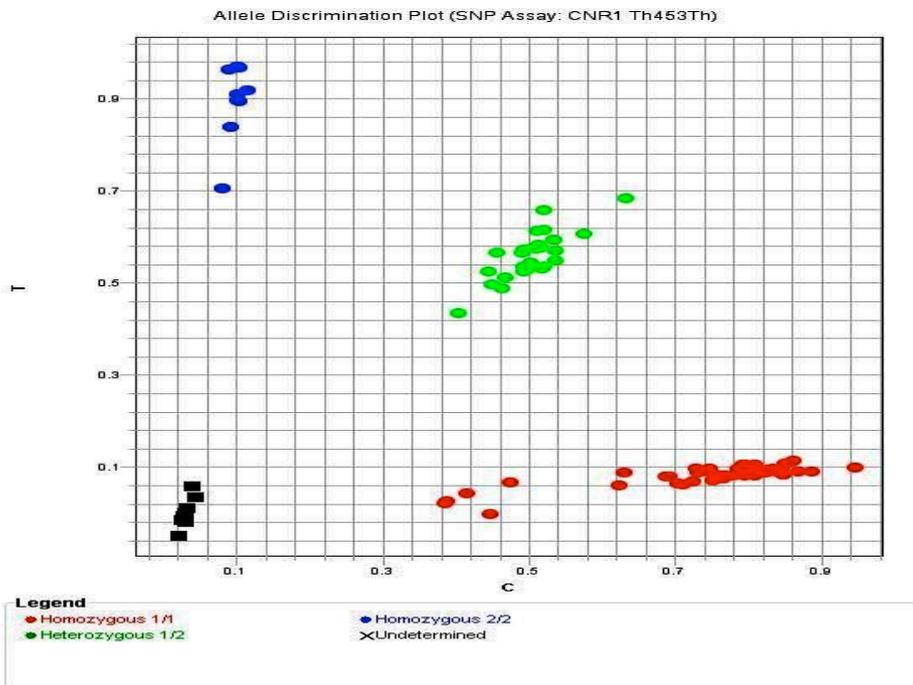
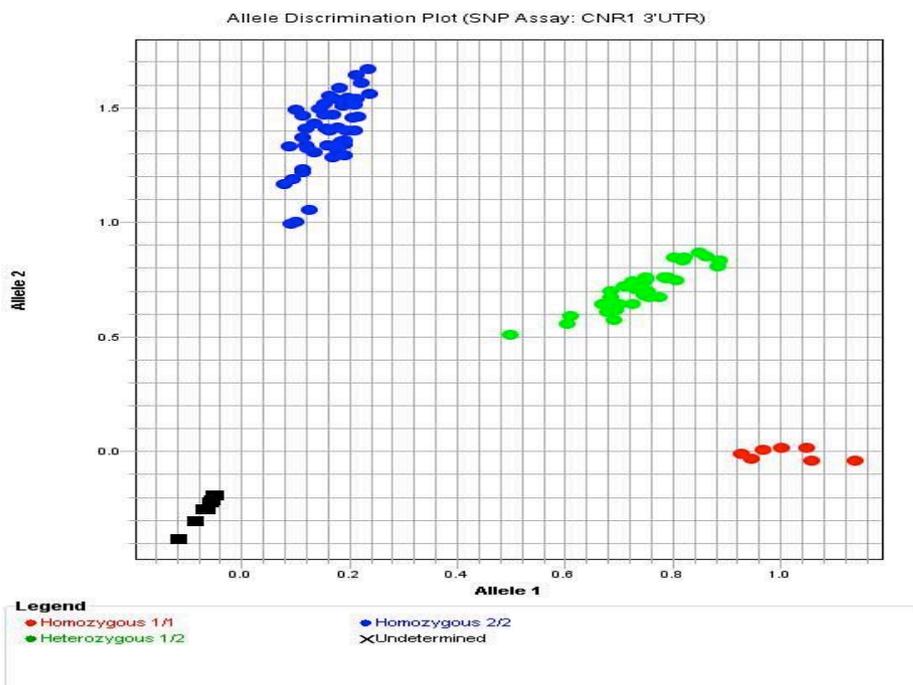


Figura 21. Discriminación alélica del polimorfismo rs806368 en una muestra de pacientes y controles



MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las variables cuantitativas se presentan como valor de la media (desviación estándar), y fueron comparadas mediante el test de la t de Student. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas, y fueron analizadas mediante el test de la χ^2 , o con el test exacto de Fisher si las frecuencias esperadas fueron menores a 5 en alguna celda.

Análisis estadístico de cada polimorfismo

Para cada polimorfismo se calculó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles por medio del test χ^2 . La asociación entre cada polimorfismo y la presencia de enfermedad se estudió mediante el test de la χ^2 , analizando la distribución de genotipos mediante tablas de 3x2, así como agrupando dichos datos en tablas 2x2 de frecuencia alélica y presencia alélica (comparando los portadores de un alelo frente al resto). Se utilizó el test exacto de Fisher si las frecuencias esperadas en las tablas de 2x2 eran menores de 5. Para todos los polimorfismos se realizó el análisis entre los grupos de alcohólicos y controles, y se comparó también la distribución de las variantes genéticas estudiadas entre los alcohólicos dependientes y los abusadores.

En los polimorfismos con una asociación significativa con la presencia de enfermedad en el análisis univariante, se analizó posteriormente cuál era el modelo de herencia que mejor explicaba el riesgo asociado con cada genotipo mediante análisis multivariante. Los tres modelos de herencia estudiados fueron el modelo general, el recesivo y el dominante. En el modelo general la hipótesis de trabajo es que cada genotipo proporciona un riesgo diferente de padecer la enfermedad (a modo de ejemplo, para un polimorfismo T/C, cada posible genotipo TT, TC y CC proporciona un riesgo diferente). En el modelo dominante una única copia del alelo modifica el riesgo para padecer la enfermedad (homocigotos CC y heterocigotos TC tendrían el mismo riesgo para el desarrollo de la enfermedad en un modelo dominante para el alelo C). En cambio, en un modelo de herencia recesivo son necesarias las dos copias de un alelo para modificar el riesgo (por lo que los genotipos TT y TC tienen el mismo riesgo, diferente de CC, en un modelo recesivo para el alelo C). La dominancia de un alelo implica el carácter recesivo del otro.

Este análisis se realizó mediante un modelo de regresión logística multivariante, introduciendo además las posibles variables de confusión. Siguiendo el ejemplo anterior, en el modelo de herencia general los genotipos TT, TC y CC se codificaron para el análisis multivariante creando dos variables indicadoras (*dummy*),

utilizando el genotipo TT como referencia. Para el modelo dominante para el alelo C, se agruparon los genotipos TC y CC en una variable, comparándolas con la variable de referencia que contenía la información del genotipo TT. Para el modelo recesivo, se agruparon los genotipos TT y TC en una variable, utilizándola como referencia para la comparación con el genotipo CC. La comparación entre los diferentes modelos se realizó mediante el criterio de información de Akaike ($AIC = 2 \cdot n^\circ \text{ parámetros} - 2 \cdot \ln \text{ verosimilitud}$), cuya fórmula incluye el ajuste del modelo (logaritmo de la verosimilitud) y el principio de parsimonia (número de parámetros), eligiendo el modelo con un menor valor de este criterio ¹⁷⁴. Para cada modelo de herencia se obtuvo la *odds ratio* (OR) con su intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Los análisis estadísticos descritos, así como los relativos a las características de la muestra (pacientes y controles), se llevaron a cabo con el programa SPSS® v20 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). El nivel de significación α se estableció en el 5%.

Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

En los polimorfismos estudiados pertenecientes al mismo gen se estimó tanto el desequilibrio de ligamiento de los mismos como la frecuencia de los haplotipos y su posible relación con la enfermedad. El análisis de haplotipos se realizó mediante el método de estimación de máxima verosimilitud ^{175, 176}, utilizando el algoritmo de expectación-maximización, con lo que se obtiene la frecuencia de cada haplotipo y su OR en relación con el haplotipo de referencia. El cálculo del desequilibrio de ligamiento se expresó mediante el coeficiente de Lewontin D' , con un valor absoluto de 1 indicando desequilibrio completo y un valor de 0 correspondiente a ausencia del mismo. Estos cálculos se realizaron con el programa THESIAS (disponible en <http://www.genecanvas.org>) y para comprobar la precisión de la estimación de haplotipos, se realizaron también con el programa Haploview (disponible en <http://www.broadinstitute.org/sections/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview>)

Cálculo de la potencia estadística

El tamaño muestral de nuestro estudio (300 casos y 157 controles) nos permitió detectar con una potencia estadística del 83,5% un polimorfismo que conferiría una OR de 2 para la presencia de enfermedad, dada una frecuencia de dicho polimorfismo en el grupo control del 20%, y un nivel de significación α del 5%. Este cálculo se realizó con el programa *PS: Power and Simple Size Calculations* v.3.0 (disponible en <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/~twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>)

¹⁷⁷.

RESULTADOS

La edad media y desviación estándar (DE) del grupo de pacientes fue de 52,5 años (DE = 12,45), y la del grupo de controles de 46,6 años (DE = 19,57), siendo esta diferencia significativa ($P = 0,002$). A su vez, también se halló una diferencia significativa ($P = 0,009$) entre la edad de los pacientes con historia de abuso de alcohol, 55 años (DE = 14,93), y la de los pacientes dependientes, 50,6 años (DE = 10,52).

A continuación se exponen los resultados del estudio de los diferentes polimorfismos en nuestros pacientes. El total de los pacientes genotipados para cada polimorfismo no equivale al total de pacientes mencionados, dado que en algunos pacientes no se pudo obtener el genotipo de algunos de los polimorfismos después de dos intentos.

Gen *OPRM1*

Polimorfismo rs1799971 (A118G)

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A118G del gen *OPRM1* se muestra en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas del polimorfismo A118G del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo AA (n, %)	Genotipo AG (n, %)	Genotipo GG (n, %)
Alcohólicos	299	213 (71,2%)	75 (25,1%)	11 (3,7%)
Abuso	112	76 (67,9%)	30 (26,8%)	6 (5,4%)
Dependencia	187	137 (73,3%)	45 (24,1%)	5 (2,7%)
Controles	156	96 (61,5%)	52 (33,3%)	8 (5,1%)
Total	455	309 (67,9%)	127 (27,9%)	19 (4,2%)

Tabla 12. Distribución de los alelos del polimorfismo A118G del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo A (n, %)	Alelo G (n, %)	AA+AG (n, %)	AG+GG (n, %)
Alcohólicos	299	501 (83,8%)	97 (16,2%)	288 (93,3%)	86 (28,8%) ^a
Abuso	112	182 (81,2%)	42 (18,8%)	106 (94,6%)	36 (32,1%)
Dependencia	187	319 (85,3%)	55 (14,7%)	182 (97,3%)	50 (26,7%) ^b
Controles	156	244 (78,2%)	68 (21,8%)	148 (94,9%)	60 (38,5%) ^{a,b}
Total	455	745 (81,9%)	165 (18,1%)	446 (98%)	146 (32,1%)

^a Portadores del genotipo AA en alcohólicos frente a controles: $P = 0,035$; OR 1,55 (IC 95%= 1,03-2,33).

^b Portadores del genotipo AA en dependientes frente a controles: $P = 0,021$; OR 1,71 (IC 95%= 1,08-2,70).

Se encontraron diferencias significativas en la distribución de los pacientes con el alelo G (genotipos AG y GG combinados) entre los pacientes alcohólicos y los controles, así como entre los alcohólicos con dependencia del alcohol y los sujetos del grupo control (tabla 12). En ese sentido, la presencia del alelo G (genotipos AG y GG) fue significativamente más frecuente en controles (38,5%), que en pacientes alcohólicos, (28,8%, $P = 0,035$) y que en el subgrupo de pacientes dependientes del alcohol (26,7%, $P = 0,021$). Por tanto, el genotipo AA se presentó con mayor frecuencia en alcohólicos con respecto a controles (OR = 1,54; IC 95% = 1,03-2,33) y en el subgrupo de alcohólicos dependientes con respecto a controles (OR = 1,7; IC 95% = 1,08-2,70), lo que coincide con la mayor frecuencia alélica de este polimorfismo en dichos grupos.

La distribución de los genotipos en los controles cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,077$; $P = 0,782$), y fue similar a la descrita en otros estudios realizados en poblaciones de individuos caucásicos^{55, 132}.

En la tabla 13 se muestra el análisis de regresión logística de los genotipos, distribuidos según los diferentes modelos de herencia. El único modelo significativo es el modelo recesivo para el alelo A, de forma que la posesión del genotipo AA se asociaba de forma significativa con la presencia de alcoholismo (OR: 1,60; IC 95%: 1,05 – 2,44; $P = 0,031$).

Tabla 13. Análisis de regresión logística de los genotipos del polimorfismo A118G del gen *OPRM1* según los distintos modelos de herencia del alelo A

Modelo para el alelo A	Alcohólicos (%)	Controles (%)	Análisis multivariante		
			OR ajustada*	IC 95%	P
General					
GG	11 (3,7%)	8 (5,1%)	1	Referencia	
GA	75 (25,%)	52 (33,3%)	1,013	0,374 – 2,743	0,980
AA	213 (71,2%)	96 (61,5%)	1,615	0,619 - 4,214	0,327
Dominante					
GG	11 (3,7%)	8 (5,1%)	1	Referencia	
GA + AA	288 (93,3%)	148 (94,9%)	1,400	0,542 – 3,616	0,487
Recesivo					
GG + GA	86 (28,8%)	60 (38,5%)	1	Referencia	
AA	213 (71,2%)	96 (61,5%)	1,597	1,045 – 2,441	0,031

* OR ajustada por la edad

Polimorfismo rs2075572 (G691C)

Los resultados obtenidos en las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G691C del gen *OPRM1* se exponen en las tablas 14 y 15. Como se observa en ellas, no se obtuvieron valores significativos al comparar los grupos de sujetos incluidos en el estudio.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del polimorfismo G691C del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo GG (n, %)	Genotipo GC (n, %)	Genotipo CC (n, %)
Alcohólicos	299	49 (16,4%)	117 (39,1%)	133 (44,5%)
Abuso	112	16 (14,3%)	49 (43,8%)	47 (42,0%)
Dependencia	187	33 (17,6%)	68 (36,4%)	86 (46,0%)
Controles	157	22 (14,0%)	67 (42,7%)	68 (43,3%)
Total	456	71 (15,6%)	184 (40,4%)	201 (44,1%)

Tabla 15. Distribución de los alelos del polimorfismo G691C del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo G (n, %)	Alelo C (n, %)	GG+GC (n, %)	CC+CG (n, %)
Alcohólicos	299	215 (36%)	383 (64%)	166 (55,5%)	250 (83,6%)
Abuso	112	81 (36,2%)	143 (63,8%)	65 (58%)	96 (85,7%)
Dependencia	187	134 (35,8%)	240 (64,2%)	101 (54%)	154 (82,3%)
Controles	157	111 (35,3%)	203 (64,7%)	89 (56,7%)	135 (86%)
Total	456	326 (35,8%)	586 (64,2%)	255 (55,9%)	385 (84,4%)

La distribución de los genotipos en controles cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,691$; $P = 0,406$). La frecuencia del alelo menor G fue similar a la referida en otros trabajos realizados en pacientes europeos^{178, 179}.

Polimorfismo rs540825

Los resultados obtenidos en el estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo se muestran en las tablas 16 y 17. No se encontraron diferencias en cuanto a la distribución de los genotipos o los alelos entre los valores obtenidos en pacientes alcohólicos y en los controles.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs540825 del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo TT (n, %)	Genotipo TA (n, %)	Genotipo AA (n, %)
Alcohólicos	299	192 (64,2%)	94 (31,4%)	13 (4,3%)
Abuso	112	70 (62,5%)	40 (35,7%)	2 (1,8%)
Dependencia	187	122 (65,2%)	54 (28,9%)	11 (5,9%)
Controles	155	101 (65,2%)	44 (28,4%)	10 (6,5%)
Total	454	293 (64,5%)	138 (30,4%)	23 (5,1%)

Tabla 17. Distribución de los alelos del polimorfismo rs540825 del gen *OPRM1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo T (n, %)	Alelo A (n, %)	TT+TA (n, %)	TA+AA (n, %)
Alcohólicos	299	478 (79,9%)	120 (20,1%)	286 (95,6%)	107 (35,8%)
Abuso	112	180 (80,4%)	44 (19,6%)	110 (98,2%)	42 (37,5%)
Dependencia	187	298 (79,7 %)	76 (20,3%)	176 (94,1%)	65 (34,7%)
Controles	155	246 (79,3%)	64 (20,7%)	145 (93,5%)	54 (34,8%)
Total	454	724 (79,7%)	184 (20,3%)	431 (94,9%)	161 (35,5%)

La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 2,77$; $P = 0,096$), y la frecuencia del alelo menor encontrada fue similar a otros estudios en poblaciones similares^{126, 180}

A pesar de que los resultados no alcanzaron significación estadística, los pacientes con abuso de alcohol mostraron una menor frecuencia del genotipo AA (1,8%) en comparación con los pacientes dependientes (5,9%, $P = 0,093$) o los controles (6,5%, $P = 0,07$). En otros términos, los pacientes con abuso de alcohol presentaron una mayor frecuencia del alelo T, y por tanto de los genotipos TT y TA, que los pacientes dependientes y controles.

Análisis de haplotipos y disequilibrio de ligamiento

Como se muestra en la figura 22, existía un disequilibrio de ligamiento importante entre los tres polimorfismos estudiados del *OPRM1*. Estos resultados fueron similares a los datos calculados por el programa THESIAS, que confirmó un disequilibrio de ligamiento significativo entre los tres polimorfismos, tal y como se muestra en la tabla 18 (rs1799971-rs2075572: $D' = -0,95$, $P < 0,001$; rs1799971-rs540825: $D' = -0,71$, $P < 0,001$; rs2075572-rs540825: $D' = 0,79$, $P < 0,001$).

Figura 22. Disequilibrio de ligamiento de los polimorfismos estudiados del gen *OPRM1*. Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$

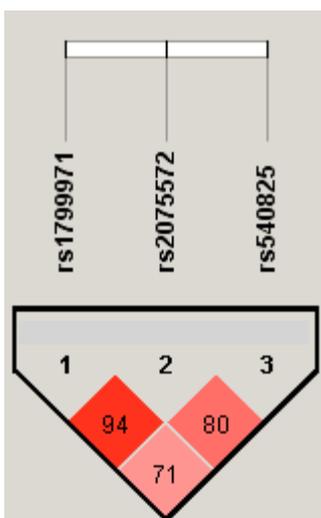


Tabla 18. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *OPRM1*

	rs1799971	rs2075572	rs540825
rs1799971		-0,95	-0,71
rs2075572	(<i>P</i> <0,001)		0,79
rs540825	(<i>P</i> <0,001)	(<i>P</i> <0,001)	

Para cada par de polimorfismos, el valor *D'*, que refleja el grado de desequilibrio de ligamiento, se indica por encima de la diagonal, mientras que el valor de *P* asociado figura por debajo de la misma.

Tabla 19. Análisis de los haplotipos del *OPRM1*.

Haplotipos	Alcohólicos	Controles	OR del haplotipo (IC 95%)	<i>P</i>
ACT	0,453	0,430	Referencia	
ACA	0,025	0,004	6,02 (0,76-47,62)	0,09
AGT	0,194	0,147	1,23 (0,81-1,87)	0,34
AGA	0,165	0,199	0,83 (0,57-1,19)	0,30
GCT	0,150	0,205	0,73 (0,49-1,07)	0,10
GCA	0,012	0,007	1,53 (0,18-12,86)	0,70
GGT	0,001	0,007	ND	
	Abuso	Dependencia		
ACT	0,461	0,446	Referencia	
ACA	0,025	0,025	1,05 (0,25-4,42)	0,94
AGT	0,185	0,202	1,09 (0,71-1,68)	0,68
AGA	0,156	0,165	1,08 (0,63-1,85)	0,78
GCT	0,159	0,141	0,92 (0,55-1,55)	0,76
GCA	0,010	0,014	1,32 (0,11-15,90)	0,83
GGT	0,003	0,008	ND	

ND: no disponible dado que no pudo ser calculado debido a la baja frecuencia del haplotipo.

La tabla 19 muestra los haplotipos que se predicen mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS. Se obtuvieron 7 haplotipos, 6 de los cuales presentaban una frecuencia superior al 1% en cada grupo.

Utilizando el programa THESIAS para el análisis de asociación de haplotipos, no se halló ningún resultado significativo para la asociación entre casos y controles. En cambio, el análisis realizado con el programa Haploview mostró que el haplotipo GCT era significativamente más frecuente en los controles (0,205) que en los alcohólicos (0,149), con un valor de $P = 0,030$ ($\chi^2 = 4,67$). Asimismo, el haplotipo ACA fue más frecuente en alcohólicos (0,022) que en controles (0,003), con $P = 0,031$ ($\chi^2 = 4,66$).

Gen *OPRD1*

Polimorfismo rs1042114 (T80G)

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en el estudio de este polimorfismo se exponen en las tablas 20 y 21. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los genotipos o los alelos entre los diferentes grupos estudiados. La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,101$; $P = 0,751$). La frecuencia del alelo menor G fue similar a la señalada en otros estudios en población de ascendencia caucásica^{142, 156}.

Tabla 20. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1042114 del *OPRD1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo GG (n, %)	Genotipo GT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	297	5 (1,7%)	67 (22,6%)	225 (75,8%)
Abuso	112	1 (0,9%)	25 (22,3%)	86 (76,8%)
Dependencia	185	4 (2,2%)	42 (22,7%)	139 (75,1%)
Controles	151	3 (2%)	40 (26,5%)	108 (71,5%)
Total	448	8 (1,8%)	107 (23,9%)	333 (74,3%)

Tabla 21. Distribución de los alelos del polimorfismo rs1042114 del *OPRD1*.

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo G (n, %)	Alelo T (n, %)	GG+GT (n, %)	GT+TT (n, %)
Alcohólicos	297	77 (13%)	517 (87%)	72 (24,2%)	292 (98,3%)
Abuso	112	27 (12,1%)	197 (87,9%)	26 (23,2%)	111 (99,1%)
Dependencia	185	50 (13,5%)	320 (86,5%)	46 (24,9%)	181 (97,8%)
Controles	151	46 (15,2%)	256 (84,8%)	43 (28,5%)	148 (98%)
Total	448	132 (13,7%)	773 (86,3%)	115 (25,7%)	440 (98,2%)

Polimorfismo rs2234918 (T921C)

En las tablas 22 y 23 se muestran los resultados del análisis de este polimorfismo, que no mostró diferencias significativas para la distribución de los genotipos o los alelos en los diferentes grupos estudiados.

Tabla 22. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs2234918 del gen *OPRD1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	299	84 (28,1%)	152 (50,8%)	63 (21,1%)
Abuso	112	29 (25,9%)	60 (53,6%)	23 (20,5%)
Dependencia	187	55 (29,4%)	92 (49,2%)	40 (21,4%)
Controles	157	52 (33,1%)	74 (47,1%)	31 (19,7%)
Total	456	136 (29,8%)	226 (49,6%)	94 (20,6%)

Tabla 23. Distribución de los alelos del polimorfismo rs2234918 del gen *OPRD1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	299	320 (53,5%)	278 (46,5%)	236 (78,9%)	215 (71,9%)
Abuso	112	118 (52,7%)	106 (47,3%)	89 (79,5%)	83 (74,1%)
Dependencia	187	202 (54%)	172 (46%)	147 (78,6%)	132 (70,6%)
Controles	157	178 (56,7%)	136 (43,3%)	126 (80,2%)	105 (66,9%)
Total	456	498 (54,6%)	414 (45,4%)	362 (79,4%)	320 (70,2%)

La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,253$; $P = 0,615$), y la frecuencia del alelo menor encontrada fue similar a otros estudios publicados previamente ¹⁸¹.

Polimorfismo rs4654327

Los resultados obtenidos en el estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo se muestran en las tablas 24 y 25. No se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos ni los alelos entre los pacientes alcohólicos y los controles.

La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,773$; $P = 0,379$). La frecuencia del alelo menor en nuestro trabajo fue de 0,49. La frecuencia descrita para el alelo menor fue similar a la referida en la *National Center for Biotechnology Information* (0,43 – 0,38) y en otros estudios ¹⁸².

Tabla 24. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs4654327 del gen OPRD1

Categoría	Individuos (n)	Genotipo AA (n, %)	Genotipo AG (n, %)	Genotipo GG (n, %)
Alcohólicos	299	72 (24,1%)	155 (51,8%)	72 (24,1%)
Abuso	112	26 (23,2%)	60 (53,6%)	26 (23,2%)
Dependencia	187	46 (24,6%)	95 (50,8%)	46 (24,6%)
Controles	155	40 (25,8%)	72 (46,5%)	43 (27,7%)
Total	454	112 (24,7%)	227 (50,0%)	115 (25,3%)

Tabla 25. Distribución de los alelos del polimorfismo rs4654327 del gen OPRD1

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo A (n, %)	Alelo G (n, %)	AA+AG (n, %)	AG+GG (n, %)
Alcohólicos	299	299 (50%)	299 (50%)	227 (75,9%)	227 (75,9%)
Abuso	112	112 (50%)	112 (50%)	86 (76,8%)	86 (76,8%)
Dependencia	187	187 (50%)	187 (50%)	141 (75,4%)	141 (75,4%)
Controles	155	152 (49%)	158 (51%)	112 (72,2%)	115 (74,2%)
Total	454	451 (49,7%)	457 (50,3%)	339 (74,7%)	342 (75,3%)

Polimorfismo rs678849

Las frecuencias genotípicas y alélicas extraídas del estudio de este polimorfismo se muestran en las tablas 26 y 27.

Tabla 26. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs678849 del gen *OPRD1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	299	74 (24,7%)	153 (51,2%)	72 (24,1%)
Abuso	112	28 (25,0%)	63 (56,3%)	21 (18,8%)
Dependencia	187	46 (24,6%)	90 (48,1%)	51 (27,3%)
Controles	155	38 (24,5%)	85 (54,8%)	32 (20,6%)
Total	454	112 (24,7%)	238 (52,4%)	104 (22,9%)

Tabla 27. Distribución de los alelos del polimorfismo rs678849 del gen *OPRD1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	299	301 (50,3%)	297 (49,7%)	227 (75,9%)	225 (75,2%)
Abuso	112	119 (53,1%)	105 (46,9%)	91 (81,2%)	84 (75%)
Dependencia	187	182 (48,7%)	192 (51,3%)	136 (72,7%)	141 (75,4%)
Controles	155	161 (51,9%)	149 (48,1%)	123 (79,3%)	117 (75,5%)
Total	454	462 (50,9%)	446 (49,1%)	350 (77,1%)	342 (75,3%)

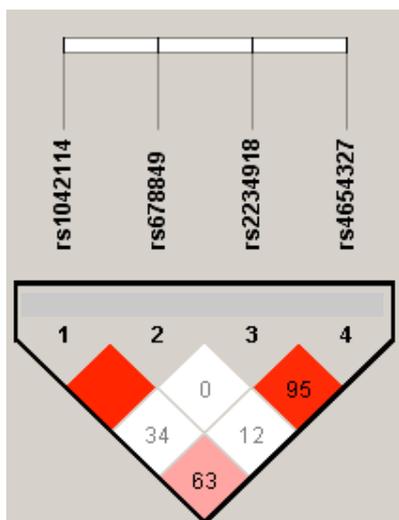
A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la distribución de los genotipos o los alelos entre los diferentes grupos de estudio, merece la pena mencionar la mayor presencia del alelo C (genotipos CC y CT) en los pacientes con abuso de alcohol (81,2%) que en los pacientes dependientes (72,7%, $P = 0,095$).

La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,5$; $P = 0,22$) y la frecuencia del alelo menor T en nuestra muestra de controles (48,1%) era similar a la encontrada en otros trabajos ¹⁸¹.

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento, analizado mediante el programa Haploview, entre los polimorfismos analizados del gen *OPRD1* se muestra en la figura 23, y el obtenido mediante el programa THESIAS se halla en la tabla 28, que estima un desequilibrio significativo entre rs1042114 y rs678849 ($D' = -0,91$, $P < 0,001$), así como entre los polimorfismos rs2234918 y rs4654327 ($D' = -0,96$, $P < 0,001$).

Figura 23. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del gen *OPRD1*



Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$ y la ausencia de valor indica desequilibrio de ligamiento completo

Tabla 28. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *OPRD1*

	rs1042114	rs678849	rs2234918	rs4654327
rs1042114		-0,91	0,21	-0,65
rs678849	$(P < 0,001)$		-0,06	0,16
rs2234918	$(P = 0,004)$	$(P = 0,101)$		-0,96
rs4654327	$(P < 0,001)$	$(P < 0,001)$	$(P < 0,001)$	

Para cada par de polimorfismos, el valor D' que refleja el grado de desequilibrio de ligamiento se indica por encima de la diagonal, mientras que el valor de P asociado se incluye por debajo de la misma.

Por otra parte, mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se identificaron 12 haplotipos (tabla 29), de los que 8 presentaban una frecuencia superior al 1% en cada grupo. El haplotipo GCCG (correspondiente a los polimorfismos rs1042114-rs678849-rs2234918-rs4654327, por este orden) fue significativamente más frecuente en el grupo de controles que en el de pacientes alcohólicos, al compararlo con el haplotipo de referencia TTCA (OR = 0,31, IC 95% = 0,13-0,72; $P = 0,006$). Este hallazgo concuerda con los resultados extraídos mediante el programa Haploview en lo que se refiere a la asociación de este haplotipo con alcoholismo, encontrando una frecuencia de 0,025 del haplotipo GCCG en alcohólicos y de 0,060 en controles ($\chi^2 = 7,32$, $P = 0,007$).

Tabla 29. Análisis de los haplotipos del *OPRD1*

Haplotipos	Alcohólicos	Controles	OR del haplotipo (IC 95%)	P
TTCA	0,271	0,268	Referencia	
TTCG	0,004	0,009	ND	
TTTA	0,008	0,006	ND	
TTTG	0,210	0,187	1,16 (0,71-1,88)	0,56
TCCA	0,189	0,195	0,95 (0,59-1,55)	0,84
TCCG	0,019	0,012	1,90 (0,36-10,08)	0,45
TCTA	0,003	0,001	ND	
TCTG	0,163	0,156	1,07 (0,68-1,69)	0,78
GTCA	0,004	0,011	ND	
GCCA	0,025	0,009	3,19 (0,69-14,78)	0,14
GCCG	0,023	0,063	0,31 (0,13-0,72)	<0,01
GCTG	0,082	0,083	0,95 (0,52-1,72)	0,86
	Abuso	Dependencia		
TTCA	0,283	0,271	Referencia	
TTCG	0,002	0,004	ND	
TTTA	0,004	0,010	ND	
TTTG	0,175	0,228	1,28 (0,70-2,34)	0,42
TCCA	0,186	0,184	1,02 (0,56-1,87)	0,95
TCCG	0,018	0,021	1,27 (0,30-5,36)	0,75
TCTA	0,001	0,004	ND	
TCTG	0,208	0,139	0,65 (0,36-1,16)	0,15
GTCA	0,006	0,001	ND	
GCCA	0,020	0,030	1,31 (0,28-6,00)	0,73
GCCG	0,012	0,030	2,77 (0,52-14,78)	0,23
GCTG	0,086	0,079	0,91 (0,43-1,96)	0,82

ND: no disponible dado que no pudo ser calculado debido a la baja frecuencia del haplotipo.

Gen *OPRL1*

Polimorfismo rs2229205

Al estudiar las frecuencias de los individuos para este polimorfismo, cuyos resultados se muestran en las tablas 30 y 31, no se encontraron diferencias entre los pacientes y los individuos sanos.

Tabla 30. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs2229205 del gen *OPRL1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	299	215 (71,9%)	75 (25,1%)	9 (3%)
Abuso	112	83 (74,1%)	26 (23,2%)	3 (2,7%)
Dependencia	187	132 (70,6%)	49 (26,2%)	6 (3,2%)
Controles	151	108 (71,5%)	40 (26,5%)	3 (2%)
Total	450	323 (71,8%)	115 (25,6%)	12 (2,7%)

Tabla 31: Distribución de los alelos del polimorfismo rs2229205 del gen *OPRL1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	299	505 (84,4%)	93 (15,6%)	290 (97%)	84 (28,1%)
Abuso	112	192 (85,7%)	32 (14,3%)	109 (97,3%)	29 (25,9%)
Dependencia	187	313 (83,7%)	61 (16,3%)	181 (96,8%)	55 (29,4%)
Controles	151	256 (84,8%)	46 (15,2%)	148 (98%)	43 (28,5%)
Total	450	761 (84,6%)	139 (15,4%)	438 (97,3%)	127 (28,2%)

La distribución de los genotipos en los individuos del grupo control cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,101$; $P = 0,751$). La frecuencia del alelo menor T (15,2%) fue similar a la descrita en otros estudios ^{146, 148}.

Gen *PNOC*

Polimorfismo rs351779

En las tablas 32 y 33 se muestran los resultados del estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo en la muestra de pacientes estudiada. No se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos estudiados. Los controles de la muestra cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,0$; $P = 0,985$). La frecuencia del alelo menor A (48%) fue similar a la descrita en otros estudios ¹⁴⁶.

Tabla 32. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs351779 del gen *PNOC*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo GG (n, %)	Genotipo GA (n, %)	Genotipo AA (n, %)
Alcohólicos	298	74 (24,8%)	161 (54%)	63 (21,1%)
Abuso	112	29 (25,9%)	59 (52,7%)	24 (21,4%)
Dependencia	186	45 (24,2%)	102 (54,8%)	39 (21%)
Controles	152	41 (27%)	76 (50%)	35 (23%)
Total	450	115 (25,6%)	237 (52,7%)	98 (21,8%)

Tabla 33. Distribución de los alelos del polimorfismo rs351779 del gen *PNOC*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo G (n, %)	Alelo A (n, %)	GG+GA (n, %)	GA+AA (n, %)
Alcohólicos	298	309 (51,8%)	287 (48,2%)	235 (78,9%)	224 (75,2%)
Abuso	112	117 (52,2%)	107 (47,8%)	88 (78,6%)	83 (74,1%)
Dependencia	186	192 (51,6%)	180 (48,4%)	147 (79%)	141 (75,8%)
Controles	152	158 (52%)	146 (48%)	117 (77%)	111 (73%)
Total	450	467 (51,9%)	433 (48,1%)	352 (78,2%)	335 (74,4%)

Polimorfismo rs17058952

Los resultados del estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo en nuestros pacientes se hallan en las tablas 34 y 35.

Los controles de la muestra cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,618$; $P = 0,432$). La frecuencia del alelo menor G (39,5%) era comparable a la descrita en trabajos previos¹⁴⁶. No se hallaron diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles, pero sí se observó una mayor presencia del alelo G en pacientes dependientes (71,6%) que en controles (62,1%, $P = 0,061$).

Tabla 34. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs17058952 del gen *PNO*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo AA (n, %)	Genotipo AG (n, %)	Genotipo GG (n, %)
Alcohólicos	299	92 (30,8%)	155 (51,8%)	52 (17,4%)
Abuso	112	39 (34,8%)	53 (47,3%)	20 (17,9%)
Dependencia	187	53 (28,3%)	102 (54,5%)	32 (17,1%)
Controles	153	58 (37,9%)	69 (45,1%)	26 (17%)
Total	452	150 (33,2%)	224 (49,6%)	78 (17,3%)

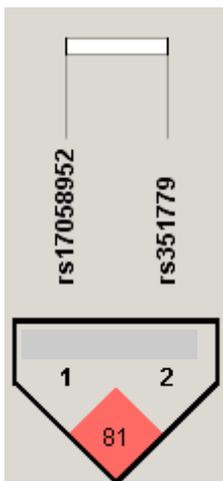
Tabla 35. Distribución de los alelos del polimorfismo rs17058952 del gen *PNO*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo A (n, %)	Alelo G (n, %)	AA+AG (n, %)	AG+GG (n, %)
Alcohólicos	299	339 (56,7%)	259 (43,3%)	247 (82,6%)	207 (69,2%)
Abuso	112	131 (58,5%)	93 (41,5%)	92 (82,1%)	73 (65,2%)
Dependencia	187	208 (55,6%)	166 (44,4%)	155 (82,9%)	134 (71,6%)
Controles	153	185 (60,5%)	121 (39,5%)	127 (83%)	95 (62,1%)
Total	452	524 (58%)	380 (42%)	374 (82,7%)	302 (66,8%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

La figura 24 muestra la existencia de un desequilibrio de ligamiento significativo entre los polimorfismos rs17058952 y rs351779, estimado por Haploview; aplicando el algoritmo THESIAS (tabla 36), se obtuvo un valor similar ($D' = -0,82$, $P < 0,001$).

Figura 24. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del gen *PNO*



Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$.

Tabla 36. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *PNO*

	rs17058952	rs351779
rs17058952		-0,82
rs351779	($P < 0,001$)	

Para cada par de polimorfismos, el valor D' que refleja el grado de desequilibrio de ligamiento se indica por encima de la diagonal, mientras que el valor de P asociado figura por debajo.

En la tabla 37 se muestran los haplotipos, identificados mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS. Se hallaron cuatro haplotipos, con una frecuencia superior al 1% en cada grupo, aunque no existen diferencias en la presencia de ninguno de estos haplotipos entre los pacientes y los controles.

Tabla 37. Análisis de los haplotipos de *PNOC*

Haplotipos	Alcohólicos	Controles	OR del haplotipo (IC 95%)	<i>P</i>
AT	0,440	0,451	Referencia	
AC	0,126	0,151	0,86 (0,56-1,34)	0,51
GC	0,392	0,368	1,09 (0,80-1,48)	0,57
GT	0,041	0,030	1,43 (0,60-3,39)	0,42
	Abusadores	Dependientes		
AT	0,446	0,437	Referencia	
AC	0,137	0,119	0,90 (0,53-1,53)	0,69
GC	0,384	0,397	1,06 (0,73-1,55)	0,75
GT	0,031	0,047	1,52 (0,63-3,69)	0,35

Gen *OPRK1*

Polimorfismo rs702764 (T843C)

Las tablas 38 y 39 muestran los resultados del estudio de las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo; no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias en los diferentes grupos estudiados de nuestra muestra.

La distribución de los genotipos en los controles de nuestra muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,003$; $P = 0,960$). La frecuencia del alelo menor C encontrada en nuestro trabajo (11,5%) fue similar a la descrita en poblaciones semejantes¹⁵⁵. También han sido descritas, en trabajos realizados en otros grupos étnicos, frecuencias genotípicas semejantes a las nuestras¹²⁵.

Tabla 38. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs702764 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo TT (n, %)	Genotipo TC (n, %)	Genotipo CC (n, %)
Alcohólicos	299	236 (78,9%)	56 (18,7%)	7 (2,3%)
Abuso	112	86 (76,8%)	22 (19,6%)	4 (3,6%)
Dependencia	187	150 (80,2%)	34 (18,2%)	3 (1,6%)
Controles	157	123 (78,3%)	32 (20,4%)	2 (1,3%)
Total	456	359 (78,7%)	88 (19,3%)	9 (2%)

Tabla 39. Distribución de los alelos del polimorfismo rs702764 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo T (n, %)	Alelo C (n, %)	TT+TC (n, %)	TC+CC (n, %)
Alcohólicos	299	528 (88,3%)	70 (11,7%)	292 (97,6%)	63 (21,1%)
Abuso	112	194 (86,6%)	30 (13,4%)	108 (96,4%)	26 (23,2%)
Dependencia	187	334 (89,3%)	40 (10,7%)	184 (98,4%)	37 (19,8%)
Controles	147	278 (88,5%)	36 (11,5%)	155 (98,7%)	34 (21,6%)
Total	446	806 (88,4%)	106 (11,6%)	447 (98%)	97 (21,3%)

Polimorfismo rs1051660 (C36T)

Se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo en nuestra población a estudio, como se muestra en las tablas 40 y 41. Al comparar estas frecuencias de los individuos alcohólicos y los controles, no se encontraron diferencias

entre ellos, así como tampoco entre los individuos con abuso de alcohol y aquellos con dependencia del consumo.

Tabla 40. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1051660 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	299	235 (78,6%)	61 (20,4%)	3 (1%)
Abuso	112	93 (83%)	17 (15,2%)	1 (1,8%)
Dependencia	187	142 (75,9%)	44 (23,5%)	1 (0,6%)
Controles	147	119 (81%)	27 (18,4%)	1 (0,7%)
Total	446	354 (79,4%)	88 (19,7%)	4 (0,9%)

Tabla 41. Distribución de los alelos del polimorfismo rs1051660 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	299	531 (88,8%)	67 (11,2%)	296 (98,9%)	64 (21,4%)
Abuso	112	203 (90,6%)	21 (9,4%)	110 (98,2%)	19 (17%)
Dependencia	187	328 (87,7%)	46 (12,3%)	186 (99,5%)	45 (24,1%)
Controles	147	265 (90,1%)	29 (9,9%)	146 (99,3%)	28 (19%)
Total	446	796 (89,2%)	96 (10,8%)	442 (99,1%)	92 (20,6%)

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,159$; $P = 0,69$). El alelo menor T presentaba una frecuencia de 9,9%, acorde con lo descrito en trabajos publicados previamente ^{154, 155}.

Polimorfismo rs963549

Las frecuencias genotípicas y alélicas resultantes del estudio de este polimorfismo se muestran en las tablas 42 y 43. No se encontraron diferencias significativas entre los pacientes y los controles de nuestro estudio.

Los controles de la muestra cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,363$; $P = 0,547$). La frecuencia del alelo menor se correspondía con lo descrito en otros estudios realizados en poblaciones semejantes ¹⁵⁵.

Tabla 42. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs963549 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	294	205 (69,7%)	81 (27,6%)	8 (2,7%)
Abuso	111	79 (71,2%)	28 (25,2%)	4 (3,6%)
Dependencia	183	126 (68,9%)	53 (29%)	4 (2,2%)
Controles	153	113 (73,9%)	38 (24,8%)	2 (1,3%)
Total	447	318 (71,1%)	119 (26,6%)	10 (2,2%)

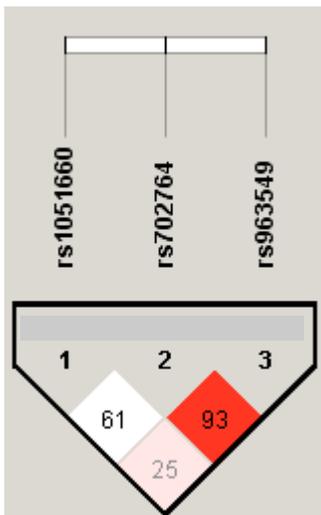
Tabla 43. Distribución de los alelos del polimorfismo rs963549 del gen *OPRK1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	294	491 (83,5%)	97 (16,5%)	286 (97,3%)	89 (30,3%)
Abuso	111	186 (83,8%)	36 (16,2%)	107 (96,4%)	32 (28,8%)
Dependencia	183	305 (83,3%)	61 (16,7%)	179 (97,8%)	57 (31,1%)
Controles	153	264 (86,3%)	42 (13,7%)	151 (98,7%)	40 (26,1%)
Total	447	755 (84,4%)	139 (15,6%)	437 (97,8%)	129 (28,8%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

La estimación del desequilibrio de ligamiento calculado con el programa Haploview se muestra en la figura 25, y fue similar al calculado mediante el algoritmo THESIAS (tabla 44), que estimó un desequilibrio de ligamiento significativo entre rs702764 y rs963549 ($D' = 0,93$, $P < 0,001$).

Figura 25. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del gen *OPRK1*



Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$.

Tabla 44. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *OPRK1*

	rs1051660	rs702764	rs963549
rs1051660		-0,50	0,30
rs702764	($P=0,047$)		0,93
rs963549	($P<0,001$)	($P<0,001$)	

Para cada par de polimorfismos, el valor D' que refleja el grado de desequilibrio se indica por encima de la diagonal, mientras que el valor de P asociado figura por debajo de ella.

Mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se identificaron 7 haplotipos, mostrados en la tabla 45 aunque no se encontraron diferencias en las frecuencias de los haplotipos entre los grupos a estudio.

Tabla 45. Análisis de los haplotipos del *OPRK1*

Haplotipos	Alcohólicos	Controles	OR del haplotipo (IC 95%)	P
CTC	0,760	0,769	Referencia	
CTT	0,012	0,007	1,83 (0,36-9,13)	0,46
CCC	0,003	0,013	0,25 (0,04-1,47)	0,12
CCT	0,110	0,086	1,39 (0,84-2,30)	0,20
TTC	0,065	0,071	0,96 (0,55-1,68)	0,89
TTT	0,044	0,038	1,19 (0,57-2,50)	0,64
TCT	0,004	0,015	0,26 (0,04-1,61)	0,15
	Abuso	Dependencia		
CTC	0,765	0,757	Referencia	
CTT	0,009	0,015	1,50 (0,27-8,14)	0,64
CCC	0,004	0,003	0,65 (0,04-9,55)	0,75
CCT	0,124	0,103	0,89 (0,52-1,54)	0,69
TTC	0,063	0,067	1,10 (0,55-2,18)	0,78
TTT	0,026	0,055	2,20 (0,83-5,84)	0,11
TCT	0,009	0,001	0,67 (0,00-210,33)	0,90

Gen *CNR1*

Polimorfismo rs1049353 (C1359T)

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo se exponen en las tablas 46 y 47.

No se encontraron diferencias en lo que se refiere a frecuencias genotípicas o alélicas entre los individuos alcohólicos y los controles sanos, así como tampoco entre los dependientes del alcohol y los que presentaban un patrón de abuso de consumo. La distribución de los genotipos de los controles cumplía el equilibrio de Hardy-

Weinberg ($\chi^2 = 1,12$; $P = 0,289$), y sus frecuencias, así como la del alelo menor T eran semejantes a las descritas previamente en poblaciones similares ^{168, 183}.

Tabla 46. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1049353 del gen CNR1

Categoría	Individuos (n)	Genotipo CC (n, %)	Genotipo CT (n, %)	Genotipo TT (n, %)
Alcohólicos	298	181 (60,7%)	100 (33,6%)	17 (5,7%)
Abuso	111	69 (62,2%)	34 (30,6%)	8 (7,2%)
Dependencia	187	112 (59,9%)	66 (35,3%)	9 (4,8%)
Controles	155	99 (63,9%)	47 (30,3%)	9 (5,8%)
Total	453	280 (61,8%)	147 (32,5%)	26 (5,7%)

Tabla 47. Distribución de los alelos del polimorfismo rs1049353 del gen CNR1

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo C (n, %)	Alelo T (n, %)	CC+CT (n, %)	CT+TT (n, %)
Alcohólicos	298	462 (77,5%)	134 (22,5%)	281 (94,3%)	117 (39,3%)
Abuso	111	172 (77,5%)	50 (22,5%)	103 (92,8%)	42 (37,8%)
Dependencia	187	290 (77,5%)	84 (22,5%)	178 (95,2%)	75 (40,1%)
Controles	155	245 (79%)	65 (20,1%)	146 (94,2%)	56 (36,1%)
Total	453	707 (78%)	199 (22%)	427 (94,3%)	173 (38,2%)

Polimorfismo rs6454674

En las tablas 48 y 49 se exponen las frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes y controles estudiados para este polimorfismo. No existían diferencias en las frecuencias entre ninguno de los grupos de la muestra. La distribución de los genotipos de los controles cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,17$; $P = 0,68$). La frecuencia del alelo menor G, así como las frecuencias genotípicas de los controles, fueron similares a las descritos previamente en otros trabajos ¹⁶⁷.

Tabla 48. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs6454674 del gen *CNR1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo TT (n, %)	Genotipo TG (n, %)	Genotipo GG (n, %)
Alcohólicos	296	147 (49,7%)	120 (40,5%)	29 (9,8%)
Abuso	110	60 (54,5%)	41 (37,3%)	9 (8,2%)
Dependencia	186	87 (46,8%)	79 (42,5%)	20 (10,8%)
Controles	146	62 (42,5%)	68 (46,6%)	16 (11%)
Total	442	209 (47,3%)	188 (42,5%)	45 (10,2%)

Tabla 49. Distribución de los alelos del polimorfismo rs6454674 del gen *CNR1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo T (n, %)	Alelo G (n, %)	TT+TG (n, %)	TG+GG (n, %)
Alcohólicos	296	414 (69,9%)	178 (30,1%)	267 (90,2%)	149 (50,3%)
Abuso	110	161 (73,2%)	59 (26,8%)	101 (91,8%)	50 (45,4%)
Dependencia	186	253 (68%)	119 (32%)	166 (89,2%)	99 (53,2%)
Controles	146	192 (65,7%)	100 (34,3%)	130 (89%)	84 (57,5%)
Total	442	606 (68,5%)	278 (31,5%)	397 (89,8%)	233 (52,7%)

A pesar de que las diferencias entre las frecuencias genotípicas no alcanzaron significación estadística, se observó una mayor presencia del alelo G en los controles sanos (57,5%) con respecto con los pacientes con abuso de alcohol (45,4%, $P = 0,055$).

Polimorfismo rs806368

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los individuos incluidos en nuestra muestra se exponen en las tablas 50 y 51.

Tabla 50. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs806368 del gen *CNR1*

Categoría	Individuos (n)	Genotipo TT (n, %)	Genotipo TC (n, %)	Genotipo CC (n, %)
Alcohólicos	297	169 (56,9%)	109 (36,7%)	19 (6,4%)
Abuso	110	68 (61,8%)	36 (32,7%)	6 (5,5%)
Dependencia	187	101 (54,0%)	73 (39,0%)	13 (7,0%)
Controles	149	88 (59,1%)	48 (32,2%)	13 (8,7%)
Total	446	257 (57,6%)	157 (35,2%)	32 (7,2%)

No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los genotipos o los alelos entre los pacientes con abuso de alcohol y los pacientes con dependencia, ni tampoco entre los alcohólicos y los controles sanos.

La distribución de los genotipos de los controles cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 2,799$; $P = 0,094$). La frecuencia del alelo menor C (24,8%) se correspondió con la descrita previamente en poblaciones semejantes¹⁶⁷.

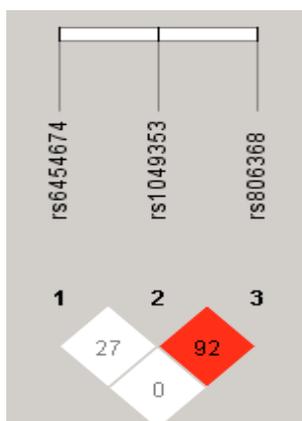
Tabla 51. Distribución de los alelos del polimorfismo rs806368 del gen *CNR1*

Categoría	Individuos (n)	Frecuencias alélicas		Presencia alélica	
		Alelo T (n, %)	Alelo C (n, %)	TT+TC (n, %)	TC+CC (n, %)
Alcohólicos	297	447 (75,2%)	147 (24,8%)	278 (93,6%)	128 (43,1%)
Abuso	110	172 (78,2%)	48 (21,8%)	104 (94,5%)	42 (38,2%)
Dependencia	187	275 (73,5%)	99 (26,5%)	174 (93%)	86 (46%)
Controles	149	224 (75,2%)	74 (24,8%)	136 (91,2%)	61 (40,9%)
Total	446	671 (75,2%)	221 (24,8%)	414 (92,8%)	189 (42,4%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

La estimación del desequilibrio de ligamiento calculado con Haploview se muestra en la figura 26 y no difiere del calculado mediante THESIAS (tabla 52), que estima un desequilibrio de ligamiento significativo entre rs1049353 y rs806368 ($D' = -0,90$, $P < 0,001$).

Figura 26. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del gen *CNR1*



Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$.

Tabla 52. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *CNR1*

	rs6454674	rs1049353	rs806368
rs6454674		-0,29	-0,03
rs1049353	(<i>P</i> =0,001)		-0,90
rs806368	(<i>P</i> =0,699)	(<i>P</i> <0,001)	

Para cada par de polimorfismos, el valor *D'* que refleja el grado de desequilibrio de ligamiento se indica por encima de la diagonal, mientras que el valor de *P* asociado figura por debajo.

La tabla 53 muestra los haplotipos obtenidos mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS. Se identificaron 6 haplotipos con una frecuencia superior al 1% en cada grupo. Dos de ellos, los haplotipos GGT y TGC (rs6454674-rs1049353-rs806368), fueron más frecuentes en pacientes con dependencia alcohólica, al compararlos con el haplotipo de referencia TGT. De forma similar, el análisis de asociación de haplotipos mediante Haploview mostró que el haplotipo TGT era significativamente más frecuente en pacientes con abuso de alcohol ($\chi^2 = 5,66$, *P* = 0,017). Considerando los resultados de ambos análisis de haplotipos, podemos afirmar, por un lado, que la presencia del haplotipo TGT era más frecuente en alcohólicos con patrón de abuso, y por otro lado, que en los pacientes dependientes de alcohol presentaban con mayor frecuencia una sustitución G/T del primer polimorfismo (haplotipo GGT) o una sustitución C/T del tercero (haplotipo TGC).

Tabla 53. Análisis de los haplotipos de *CNR1*

Haplotipos	Alcohólicos	Controles	OR del haplotipo (IC 95%)	P
TGT	0,350	0,321	Referencia	
GGT	0,178	0,217	0,75 (0,47 - 1,19)	0,222
TGC	0,171	0,163	0,97 (0,58 - 1,61)	0,917
TAT	0,172	0,153	1,04 (0,64 - 1,69)	0,869
GGC	0,075	0,087	0,79 (0,41 - 1,54)	0,488
GAT	0,050	0,049	0,93 (0,45 - 1,94)	0,867
TAC	0,003	0,010	0,27 (0,02 - 3,26)	0,305
	Abusadores	Dependientes		
TGT	0,424	0,300	Referencia	
GGT	0,132	0,211	2,26 (1,27 - 4,05)	0,006
TGC	0,117	0,204	2,41 (1,33 - 4,38)	0,004
TAT	0,179	0,173	1,36 (0,79 - 2,34)	0,260
GGC	0,099	0,059	0,80 (0,35 - 1,80)	0,588
GAT	0,041	0,050	1,83 (0,76 - 4,43)	0,177
TAC	0,007	0,001	N/D	

ND: no disponible, al no poder ser calculado debido a la baja frecuencia del haplotipo.

DISCUSIÓN

Está bien establecido que en el desarrollo de muchas de las enfermedades que afectan al ser humano, sobre todo las enfermedades crónicas, influyen factores ambientales y factores genéticos. En un intento por comprender mejor la fisiopatología de estos trastornos, se han llevado a cabo estudios genéticos de asociación, en los que se relacionan determinadas variantes del genoma humano con la predisposición a padecer una determinada enfermedad.

El alcoholismo es una de las enfermedades en cuya aparición intervienen factores ambientales y genéticos capaces de interactuar entre sí; de ahí que se hayan realizado múltiples trabajos dirigidos a identificar posibles cambios genéticos implicados en el desarrollo de la enfermedad. Todos ellos avalan la existencia de una relación entre determinadas variantes alélicas en los genes de los sistemas implicados en la neurobiología del alcohol y los circuitos de recompensa cerebral, por un lado, y la susceptibilidad al alcoholismo, por otro. El conocimiento de estas variantes genéticas es de gran interés porque puede permitir la prevención y tratamiento precoz del alcoholismo en los individuos que las poseen, así como una estratificación del riesgo de recaída en el consumo del tóxico. Asimismo, es un hecho conocido que la eficacia de los tratamientos usados para el alcoholismo varía significativamente de unos individuos a otros, y existen evidencias que apuntan a que la razón de esta variabilidad pudiera residir, al menos en parte, en la existencia de variantes genéticas que modificasen la respuesta a un determinado fármaco ¹⁸⁴. Por tanto, avanzar en el conocimiento de las variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad al alcoholismo también permitiría profundizar en la farmacogenética de esta enfermedad; y todo ello podría plantear el uso de tratamientos más eficaces en pacientes seleccionados.

En consonancia con lo anterior, nuestro trabajo se enmarca en el contexto de los estudios que tratan de identificar las variantes genéticas concretas implicadas en la susceptibilidad al alcoholismo. Para ello, hemos estudiado 16 variantes genéticas localizadas en dos de los sistemas más importantes de la neurobiología del alcohol, el opioide y el endocannabinoide. Hemos llevado a cabo el análisis de su relación con el abuso de alcohol y con el desarrollo de dependencia alcohólica, estudiando cada SNP no sólo de forma individual, sino también mediante análisis de haplotipos, lo cual proporciona, por lo que se refiere a su posible asociación con una enfermedad, un mayor poder estadístico que el análisis aislado de un único *locus*, dado que la interacción entre variantes genéticas puede ser de especial relevancia en la función de ciertos genes ¹⁸⁵.

VARIANTES GENÉTICAS DEL SISTEMA OPIOIDE

Gen del receptor opioide- μ (*OPRM1*)

Polimorfismo rs1799971 (A118G)

En nuestro trabajo hemos encontrado diferencias significativas en la presencia del genotipo AA entre los pacientes alcohólicos y los controles ($P = 0,035$), así como entre los alcohólicos con dependencia y los controles ($P = 0,021$). Entre los resultados obtenidos, destacaba que el genotipo AA fue significativamente más frecuente en los pacientes alcohólicos (83,8%) que en los controles (78,2%), con una OR de 1,54 (IC 95%=1,03-2,33) para la presencia de alcoholismo, y con una OR de 1,7 (IC 95%=1,08-2,7) para la presencia de dependencia alcohólica. Expresado de otra forma, la presencia del alelo G, y por tanto de los genotipos AG y GG, fue significativamente más frecuente en los individuos del grupo control al compararlos tanto con el grupo de alcohólicos en general como con los pacientes con dependencia del alcohol. El análisis de regresión logística, una vez introducida la edad como potencial factor de confusión, confirmó que la posesión del genotipo AA se asociaba de forma significativa con la presencia de alcoholismo (OR: 1,60; IC 95%: 1,05 – 2,44; $P = 0,031$) al comparar el grupo de pacientes alcohólicos (definido como abuso o dependencia de alcohol) con el de los controles. A la luz de estos resultados, en nuestro estudio podríamos concluir que la presencia del alelo G (genotipos AG y GG) tendría un efecto protector sobre el desarrollo de alcoholismo, mientras que el genotipo AA se comportaría como un factor de riesgo de dicha enfermedad.

Nuestros resultados coinciden con lo obtenido en algunos estudios previos, tanto en dependencia alcohólica en pacientes caucásicos^{113, 186} como en dependencia a heroína en otros grupos étnicos^{105, 114}, en los que la presencia del alelo G también era más frecuente en los controles. Sin embargo, determinados trabajos no han corroborado esta asociación^{104, 116, 117, 123}, e incluso en algunos de ellos la presencia del alelo G se asoció con un aumento del riesgo de dependencia a alcohol^{110, 111} u a otras drogas^{109, 112}.

Ante la gran cantidad de estudios con resultados dispares entre sí, Arias y cols.¹⁰⁸ llevaron a cabo un metanálisis que incluyó 28 trabajos sobre la relación del polimorfismo A118G con la dependencia a diversas sustancias de abuso, como opioides y cocaína, además de etanol, en diferentes poblaciones y grupos étnicos. Su conclusión fue que no existía una asociación significativa entre este polimorfismo y la dependencia a esas sustancias, incluido el alcohol. No obstante, analizando individualmente los estudios sobre dependencia alcohólica incluidos en el citado

metanálisis, en 7 de ellos sí se obtenían resultados significativos, destacando en particular que en 4 estudios la frecuencia del alelo G era mayor en los pacientes alcohólicos que en los controles ¹⁰⁹⁻¹¹², mientras que en los otros 3 la frecuencia era mayor en los controles que en los sujetos alcohólicos ^{105, 113, 114}, lo que indica una gran heterogeneidad de los resultados.

Existen varias explicaciones para esta disparidad de datos. En primer lugar, hay que señalar que los criterios de inclusión y exclusión difieren en cierta medida entre los diferentes estudios, por ejemplo en variables como la inclusión o no de pacientes con comorbilidades psiquiátricas, consumo de tabaco o selección de individuos del grupo control. Estas diferencias en cuanto a las muestras de pacientes y controles, hacen que, en caso de que el polimorfismo se asociase con otro rasgo fenotípico diferente de la adicción al alcohol, se pudieran obtener resultados falsamente positivos. A la inversa, determinadas características fenotípicas podrían actuar como un factor de confusión y conducir a resultados falsamente negativos.

Por otra parte, es importante señalar que la frecuencia del alelo menor G difiere también dependiendo de los estudios. Así, Bart y cols. ^{109, 110} encontraron en individuos controles una frecuencia de dicho alelo más baja (7,4%) que la obtenida, por ejemplo, en el estudio de Schinka y cols. ¹¹³, en el que alcanzaba el 13,6%. Esta variabilidad en la frecuencia de la mutación en distintas poblaciones se ha comprobado en otros estudios, de tal forma que en EEUU se han comunicado frecuencias del alelo menor G desde 4,7% en sujetos de origen africano hasta 48,5% en descendientes de orientales, pasando por 15,4% en los de origen europeo ¹¹⁷. Con todos los datos expuestos, resulta difícil establecer de forma clara el papel que desempeña este polimorfismo en el riesgo de desarrollar dependencia alcohólica, ya que su efecto podría ser diferente en función de otros factores que interactúen con el polimorfismo, tales como otras características genéticas o algunos factores ambientales.

Entre los posibles factores de confusión implicados, podría incluirse una potencial asociación del polimorfismo A118G con la dependencia a la nicotina, ya que algunos estudios sugieren que la presencia del alelo G de esta variante genética puede modificar la respuesta al tratamiento de deshabituación a la nicotina en sujetos con dependencia a la misma ¹⁸⁷. Por tanto, la inclusión en los estudios mencionados de pacientes o controles con dependencia a la nicotina podría modificar los resultados globales del estudio. En nuestro trabajo, al igual que en muchos otros realizados sobre este polimorfismo, la adicción a nicotina no fue tomada en consideración entre los criterios de inclusión o exclusión, ni se estratificó la muestra en base al consumo o no de tabaco, por lo que no podemos sacar conclusiones a este respecto.

El sexo es otro factor que podría modificar la respuesta a este polimorfismo, y varios autores sostienen que podrían existir diferencias entre el sexo masculino y el femenino. Por ejemplo, Kim y cols.¹⁸⁸ refieren una mayor frecuencia del alelo G en mujeres con dependencia del alcohol con respecto a controles sanos, mientras que no encuentran este incremento de frecuencia en varones, sugiriendo una posible estratificación por sexos en la asociación de este polimorfismo con la enfermedad alcohólica. La totalidad de nuestra muestra eran varones, por lo que no podemos confirmar estos resultados.

Al igual que ocurre en otros casos, otra posible explicación de las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos en estudios previos es que este polimorfismo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otra variante genética no analizada, que sería la que transmitiese realmente la susceptibilidad a la dependencia de sustancias, y que el grado de desequilibrio de ligamiento entre ambas mutaciones variase según la población estudiada.

Estudios realizados sobre su posible significado funcional muestran que el polimorfismo A118G implica un cambio de asparragina (Asn) por aspartato (Asp) en la posición 40 de la cadena de aminoácidos del receptor opioide μ . Algunos trabajos postulan que, en presencia del alelo G (Asp40), la afinidad de las β -endorfinas con el receptor opioide es hasta tres veces mayor que la del receptor que contiene Asn40¹⁰⁵. Este hecho supondría un aumento en la funcionalidad del receptor, lo cual, considerando la neurobiología del alcohol, incrementaría la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens*, contribuyendo así a las acciones reforzantes del etanol y a un mayor riesgo de desarrollar dependencia alcohólica. Sin embargo, esta relevancia funcional no está tampoco comprobada, ya que en otros estudios la presencia del alelo G (Asp40) no se asoció con cambios importantes en la funcionalidad del receptor¹⁰⁶,¹⁸⁹, e incluso en un trabajo se relacionó con una reducción de la expresión del receptor¹⁰⁷. En nuestro análisis, la mayor frecuencia del alelo G en los individuos del grupo control iría en contra de la hipótesis según la cual la mutación incrementa la actividad del receptor.

Existen, por tanto, resultados contradictorios respecto al significado funcional de esta mutación, que dificultan la interpretación de la distribución genotípica y alélica. A la luz de los potenciales factores comentados, este hecho puede ser un reflejo de las interacciones entre los factores genéticos y ambientales que caracterizan los trastornos adictivos.

Polimorfismos rs2075572 y rs540825

Los otros dos polimorfismos del *OPRM1* incluidos en este trabajo han sido escasamente estudiados previamente. Respecto al polimorfismo rs2075572 (G691C), en nuestro estudio no hallamos evidencia de su posible asociación con la dependencia alcohólica, lo que concuerda con los resultados de un trabajo anterior ⁵⁵, en el que tampoco pudo establecerse dicha relación.

En cuanto al polimorfismo rs540825, observamos una mayor frecuencia del alelo T en pacientes con abuso de alcohol que en controles, aunque los resultados no alcanzaron significación estadística. Este polimorfismo no mostró una asociación estadísticamente significativa con la dependencia a opioides en un trabajo previo ¹⁸⁰, y, en nuestro conocimiento, no hay estudios previos en dependencia alcohólica con los que se puedan contrastar nuestros hallazgos.

Estudio de haplotipos del gen OPRM1

En el estudio realizado sobre la posible asociación de haplotipos del gen *OPRM1* y alcoholismo, un haplotipo constituido por el alelo G del polimorfismo rs1799971, el alelo C del rs2075572 y el alelo T del rs540825 fue más frecuente en los controles (20,5%) que en el grupo de individuos alcohólicos (14,9%), con un valor de $P = 0,030$ ($\chi^2 = 4,67$). Esto apoya los resultados obtenidos en el análisis de las frecuencias alélicas del polimorfismo rs1799971 de forma individual, dado que la presencia del alelo G presentaba una frecuencia significativamente mayor en los controles que en pacientes alcohólicos. El haplotipo ACA, que incluye el alelo A del polimorfismo rs1799971, fue más frecuente en alcohólicos pero dada su baja frecuencia (0,022 en alcohólicos y 0,003 en controles), parece poco probable que tenga relevancia.

Respecto a las otras dos variantes genéticas analizadas del gen *OPRM1*, es posible que su asociación con alcoholismo se deba fundamentalmente al desequilibrio de ligamiento que presentan con el polimorfismo rs1799971 (A118G). No se puede descartar, en todo caso, que la interacción entre estos polimorfismos también influya de forma directa en la presencia de alcoholismo. Otros análisis similares han confirmado la asociación entre haplotipos de variantes del *OPRM1* y la dependencia a sustancias ^{55, 122}, pero no hemos encontrado trabajos que impliquen las mismas variantes alélicas y, por tanto, que sean comparables directamente con nuestros resultados.

En conjunto, los hallazgos encontrados para el *OPRM1* en nuestro trabajo apuntan hacia una implicación del polimorfismo A118G de dicho gen en el desarrollo de alcoholismo. Sin embargo, la existencia de resultados controvertidos en la

literatura, probablemente debidos a factores de confusión difíciles de controlar sobre la relación entre dicho polimorfismo y el consumo de alcohol, hace difícil establecer conclusiones definitivas, tanto a nivel individual como al considerar el análisis por haplotipos.

Gen del receptor opioide- δ (*OPRD1*)

En nuestro trabajo tampoco encontramos diferencias significativas en cuanto a la distribución de frecuencias alélicas o genotípicas entre alcohólicos y controles en ninguno de los cuatro polimorfismos estudiados del *OPRD1*, el rs1042114, el rs2234918, el rs678849 y el rs4654327. Estos resultados confirman los datos aportados por estudios previos respecto a los tres primeros polimorfismos citados, en los que no se halló asociación con el alcoholismo^{125, 142, 143}. En cuanto al polimorfismo rs4654327, no hay datos previos publicados sobre su posible relación con la dependencia alcohólica, por lo que no pueden establecerse comparaciones de nuestros resultados.

Aunque no se obtuvieron resultados significativos de forma global, es importante señalar que en el estudio del polimorfismo rs678849 se encontró una mayor presencia del alelo C (genotipos CC y CT) en los pacientes con abuso de alcohol (81,2%), que en los pacientes dependientes (72,7%, $P = 0,095$). Es decir, se trata de una tendencia, no significativa, hacia el alelo C como factor protector de la dependencia alcohólica. Sólo hemos encontrado en la literatura previa un estudio, publicado por Zhang y cols.¹⁴², en el que se haya analizado este polimorfismo en el alcoholismo, sin encontrar tampoco una asociación significativa con el mismo. En cualquier caso, es importante considerar que las poblaciones del citado estudio y del nuestro no son directamente comparables, fundamentalmente debido a la distribución por sexos y, en menor medida, por el origen étnico de los pacientes. Así, aunque ambas poblaciones pueden considerarse caucásicas, el estudio de Zhang y cols. incluyó sujetos estadounidenses de origen europeo, mientras que nuestra muestra se compone de españoles de raza blanca y origen europeo. Por otro lado, el 30% de los pacientes del estudio de Zhang y cols. son mujeres, mientras que en nuestra muestra todos los individuos son varones. Es posible también que el alelo C del polimorfismo rs678849 tenga un papel protector del desarrollo de dependencia al alcohol en nuestra población, y que nuestros resultados para este polimorfismo concreto no alcancen significación debido a un poder estadístico limitado, o bien que se deban al azar o a

que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otro marcador no conocido de mayor relevancia.

Estudio de los haplotipos del gen OPRD1

Aunque en el análisis individual por polimorfismos no se han encontrado resultados significativos, en nuestro trabajo sí se alcanzaron resultados significativos al estudiar haplotipos del gen *OPRD1*: al compararlo con el haplotipo de referencia TTCA, el haplotipo GCCG (correspondiente a los polimorfismos rs1042114-rs678849-rs2234918-rs4654327, por este orden) presentó una frecuencia significativamente mayor en los controles que en los pacientes alcohólicos, resultado consistente en los dos métodos de análisis de haplotipos que hemos empleado. Por tanto, la presencia de este haplotipo podría desempeñar un papel protector en el desarrollo de alcoholismo de acuerdo a nuestros datos. Por el contrario, el ya citado estudio de Zhang y cols.¹⁴² demostró que un haplotipo compuesto por 6 alelos de riesgo, entre los cuales se incluían el alelo G del rs1042114, el C del rs678849 y el C del rs2234928, se asociaba con dependencia alcohólica, de tal forma que era significativamente más frecuente en alcohólicos dependientes que en controles. Para comparar estos resultados con los de nuestro estudio, es preciso considerar, en primer lugar, que el haplotipo encontrado en el estudio de Zhang y cols. contenía otros 3 polimorfismos que nosotros no hemos estudiado, alguno de los cuales, u otro marcador desconocido que se transmita junto a ellos, podría ser el verdadero responsable de la asociación de ese haplotipo con la dependencia alcohólica. Como ocurre con otros hallazgos, es posible también que las diferencias entre el estudio de Zhang y cols. y el nuestro se deban a la existencia de grupos poblacionales distintos o a la interacción con otras variantes genéticas. En todo caso, la baja frecuencia de este haplotipo tanto en nuestro estudio como en el de Zhang (0,060 y 0,047 en controles, respectivamente) hace difícil plantear que pueda tener una gran importancia a nivel poblacional para explicar la susceptibilidad a al alcoholismo.

En conclusión, de acuerdo a nuestros resultados y a datos previos, no podemos afirmar que los polimorfismos estudiados del *OPRD1* en nuestro trabajo influyan claramente de forma individual en la susceptibilidad a la dependencia alcohólica. Sin embargo, los hallazgos positivos encontrados previamente en cuanto a la asociación de estas variantes alélicas con la dependencia a opioides, y los datos procedentes de los estudios de haplotipos, sí que sugieren una implicación de las variantes genéticas en la secuencia del *OPRD1* en la adicción a drogas de abuso. Es perfectamente plausible, por tanto, que estos SNP no se asocien de manera independiente con la dependencia o el abuso de alcohol, y sí a través de su

interacción con otros alelos de riesgo, con los que se transmitan en desequilibrio de ligamiento, o con los que interaccionen.

También es importante considerar que las variaciones genéticas en el *OPRD1* pueden no estar relacionadas con la presencia de alcoholismo, pero sí con las diferencias interindividuales observadas en las respuestas a los tratamientos de la adicción. Así, un trabajo publicado en 2012 por Asherhurst y cols.¹⁹⁰ señala que los portadores del alelo A del polimorfismo rs4654327 presentan un mayor efecto del tratamiento con naltrexona que los homocigotos GG, aunque otros trabajos no han replicado este hallazgo^{129, 132}.

Gen del receptor opioide-λ (*OPRL1*) y gen de la pronociceptina (*PNOG*)

Polimorfismo rs2229205 del gen OPRL1

En el estudio de este polimorfismo no hemos encontrado una distribución diferente del mismo en ninguno de los grupos de estudio al compararlos entre sí. Estos resultados coinciden con los trabajos publicados previamente, en los que tampoco se encontró relación entre el polimorfismo citado y la dependencia al alcohol o a otras drogas¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Polimorfismos rs351779 y rs17058952 del gen PNOG

En el estudio del gen *PNOG*, que codifica la pronociceptina, se incluyeron los polimorfismos rs351779 y rs17058952, situados en la región 3'UTR y en la región promotora 5'UTR, respectivamente. En el estudio del rs351779 no se obtuvieron diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas o genotípicas entre los pacientes y los controles. Sin embargo, al analizar las frecuencias del SNP situado en la región 5'UTR encontramos una mayor presencia del alelo menor G en pacientes dependientes (71,6%) que en los controles (62,1%), si bien no se alcanzó una significación estadística ($P = 0,061$) de acuerdo al nivel fijado. Se dispone de un estudio previo, realizado por Xuei y cols.¹⁴⁶, realizado sobre una muestra de pacientes de EEUU con ancestros europeos, en el que se observó una frecuencia significativamente mayor del alelo menor de ambos polimorfismos en pacientes dependientes del alcohol en comparación con individuos controles sanos. Así pues, aunque no se puedan establecer conclusiones definitivas, el conjunto de los resultados disponibles apuntan hacia una posible implicación del gen *PNOG*, al menos del polimorfismo localizado en la región 5'UTR (rs17058952), en la dependencia alcohólica.

Estudio de los haplotipos del gen PNOC

Mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se han identificado cuatro haplotipos del gen *PNOC*, con una frecuencia superior al 1%. Al comparar su frecuencia entre los diferentes grupos de estudio, no encontramos diferencias significativas en los diferentes grupos de estudio. En nuestro conocimiento, en pacientes con dependencia alcohólica no se han estudiado previamente haplotipos que contengan estos dos polimorfismos, por lo que no es posible comparar nuestros resultados con otros previos de la literatura.

Gen del receptor opioide- κ (*OPRK1*)

En el presente trabajo se estudiaron tres SNP de este gen, dos de ellos localizados en las regiones codificantes, el rs702764 (T843C) y el rs1051660 (C36T), y uno situado en la región 3'UTR, el rs963549.

Polimorfismo rs702764 (T843C)

Es una mutación silente, localizada en el exón 3. Al comparar en nuestro estudio las frecuencias genotípicas y alélicas de este polimorfismo en el grupo de pacientes con los controles, no hallamos diferencias significativas entre ambos grupos. Estos hallazgos están en consonancia con lo descrito en otros estudios, tanto en poblaciones caucásicas^{155, 156} como en otras etnias^{125, 157}. En nuestro conocimiento, no existen trabajos previos en los que sí se hayan obtenido resultados significativos al relacionar la presencia de este polimorfismo con la dependencia alcohólica.

Polimorfismo rs1051660 (C36T)

Localizado en el exón 1, este polimorfismo está considerado también una mutación silente. En trabajos previos se han encontrado asociaciones significativas del mismo con la dependencia a opiáceos^{149, 154}. Sin embargo, los trabajos en los que se ha analizado su posible relación con la dependencia alcohólica no han aportado resultados significativos^{125, 142, 155, 156}, al igual que en nuestro trabajo, en el que tampoco encontramos ninguna asociación entre la presencia del polimorfismo y la predisposición al abuso o la dependencia al alcohol.

Polimorfismo rs963549

En el análisis de este polimorfismo tampoco se ha puesto en evidencia en nuestro trabajo que la presencia del mismo contribuya por sí sola a la dependencia alcohólica. Este resultado concuerda con lo publicado previamente ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Estudio de los haplotipos del OPRK1

Por lo que se refiere al análisis de los haplotipos del gen *OPRK1*, los datos de nuestro estudio no muestran ninguna asociación significativa con la dependencia alcohólica. En cambio, otros estudios de haplotipos publicados en la literatura sí han mostrado resultados significativos. En concreto, en el trabajo publicado por Zhang y cols. ¹⁴², un haplotipo compuesto por 7 variantes genéticas del *OPRK1* (incluyendo los tres SNP estudiados en nuestro trabajo), se asoció de forma significativa con la dependencia alcohólica en una muestra de individuos norteamericanos. En todo caso, dado que nuestro trabajo estaba basado únicamente en 3 polimorfismos, mientras que la asociación con la dependencia en el trabajo citado estuvo basada en la inclusión de 7 SNP, los resultados no pueden ser comparados directamente.

Resulta interesante destacar que algunas de las variantes genéticas de este haplotipo se encuentran localizadas en regiones no codificantes del gen, como las descritas en el intrón 2. En un principio, cabría pensar que estas mutaciones, al estar localizadas en porciones no traducidas, no afectarían a la estructura final de la proteína, ni por tanto a su función. Sin embargo, como se ha señalado previamente, estas mutaciones pueden ir ligadas a cambios en la expresión del gen, o en la eficacia de la traducción, afectando así a la funcionalidad del receptor. De esta forma, pueden tener un papel relevante en la señalización del sistema opioide y en el desarrollo de la dependencia del alcohol ¹⁹¹.

Otra posibilidad es que los SNP estudiados contribuyan a la dependencia alcohólica al interactuar con alelos de riesgo contenidos en otros genes. La relación con dependencia a sustancias de abuso de la interacción entre alelos del *OPRK1* y del gen *OPRM1* ha sido sugerida en un estudio reciente realizado en una población de origen indio ¹⁵⁷. En dicho trabajo, la coexistencia del alelo G del polimorfismo A118G del gen *OPRM1* y diversas variantes alélicas de tres polimorfismos (rs702764, rs1691885 y rs963549) del gen *OPRK1* se asoció con la dependencia a alcohol y a opiodes; sin embargo, el estudio de los alelos de riesgo por separado no puso de manifiesto una asociación significativa con dicha patología. En todo caso, es preciso considerar que este tipo de estudios presentan un elevado riesgo de error tipo alfa, por lo que es necesario tomar estos resultados con suma cautela.

Finalmente, aunque existen datos controvertidos al respecto ^{129, 190}, no puede descartarse que estos polimorfismos tengan influencia en la respuesta al tratamiento con naltrexona en pacientes con alcoholismo.

VARIANTES GENÉTICAS DEL SISTEMA CANNABINOIDE

Polimorfismo rs1049353 (G1359A)

No encontramos diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas y alélicas de esta variante en los diferentes grupos de sujetos incluidos en nuestro trabajo. Otros estudios realizados en pacientes alcohólicos, como el de Preuss y cols. ¹⁶⁸, realizado en población caucásica con dependencia alcohólica, y el de Zuo y cols. ¹⁶⁷, en pacientes de otras etnias, tampoco han mostrado una asociación significativa del alcoholismo con el citado polimorfismo. No es extraño, por tanto, que los resultados de un metanálisis publicado recientemente tampoco apoyen la asociación de este polimorfismo individual con el alcoholismo. ¹⁷⁰. Asimismo, se han obtenido resultados negativos al intentar relacionar esta variante genética con la dependencia a drogas de abuso como el cannabis ¹⁹² o los opiáceos ¹⁶⁵.

Por el contrario, Schmidt y cols. ¹⁶⁶ sí hallaron en una población de pacientes con dependencia alcohólica y manifestaciones mayores de abstinencia de alcohol, como delirium, una asociación de alcoholismo y esta variante genética. En concreto, este trabajo mostró una diferencia estadísticamente significativa entre la prevalencia del alelo A en pacientes al compararlos con controles sanos, y una mayor frecuencia del genotipo AA en sujetos con una historia de delirium. Para explicar la discrepancia entre este trabajo y los que han aportado un resultado negativo, incluido el nuestro, cabe considerar en primer lugar que el fenotipo analizado es diferente, ya que la muestra objeto de estudio en el trabajo de Schmidt y cols. no incluía pacientes con abuso de alcohol o con síntomas menores de abstinencia. Es posible, por tanto, que el resultado positivo encontrado por estos autores no se deba a la relación entre esta variante y la dependencia al alcohol, sino a una asociación específica con el desarrollo de delirium. Apoya esta hipótesis el hecho de que la mayor frecuencia del genotipo AA se obtuviera sólo en el subgrupo de pacientes con delirium, y no en el subgrupo de pacientes con antecedentes de convulsiones como consecuencia de la abstinencia. Hay que señalar también que esta mutación ha sido objeto de estudio por su posible relación con varios desórdenes psiquiátricos, como el síndrome de Gilles de la Tourette ¹⁹³ o la esquizofrenia ¹⁹⁴. Por tanto, otra de las posibles causas de la asociación encontrada en el estudio de Schmidt y cols., hallazgo que no ha sido replicado

posteriormente, es que en su muestra no se hubieran excluido de forma adecuada a individuos con patología psiquiátrica, lo que podría dar lugar a resultados falsamente positivos en lo que se refiere a la asociación con la dependencia a sustancias de abuso. En nuestro trabajo se excluyeron todos los pacientes con abuso de otras sustancias adictivas, excepto el tabaco, así como los pacientes con patología psiquiátrica, ya afectase a ellos mismos o a sus familiares de primer grado. En todo caso, y a la luz de todos los resultados mencionados y de los datos de nuestro propio trabajo, podemos concluir que este polimorfismo, de forma individual, no confiere vulnerabilidad al desarrollo de dependencia alcohólica. El genotipo AA podría estar asociado con un mayor riesgo de desarrollo de delirium en pacientes alcohólicos con síndrome de abstinencia, aunque es preciso confirmar este resultado antes de considerarlo definitivo.

Entre las razones que explican la falta de asociación entre este polimorfismo y la dependencia alcohólica, podemos mencionar fundamentalmente que el polimorfismo analizado es una mutación silente, sin efecto conocido sobre la función del receptor cannabinoide CB1. Sin embargo, esta mutación es frecuente en población caucásica, donde se han descrito frecuencias poblacionales del alelo A entre 24 y 32 %¹⁹³, por lo que resulta interesante analizar su interacción con otros polimorfismos mediante el análisis de haplotipos o con factores ambientales, dado su impacto potencial sobre la población.

Polimorfismo rs6454674

Tampoco se encontraron diferencias significativas en nuestro trabajo al analizar dicho polimorfismo, aunque sí se observó una mayor frecuencia –sin significación estadística- del alelo G en los controles sanos que en los pacientes con abuso de alcohol. Este polimorfismo fue estudiado por Zuo y cols. en 2007¹⁶⁷ en una muestra de pacientes estadounidenses de origen europeo, encontrándose una asociación significativa entre la presencia del alelo G y la dependencia a drogas (cocaína, opioides) y alcohol; además, en los pacientes con dependencia a varias sustancias (incluido el etanol) se halló una interacción significativa entre los genotipos que contenían el alelo G (genotipos TG y GG) de este polimorfismo y el genotipo TT del polimorfismo rs806368 del mismo gen, aspecto que se analizará más adelante en este trabajo.

Aparte de poder constituir un resultado falso negativo debido al azar o al bajo tamaño de la muestra, hay que señalar que en el trabajo de Zuo y cols. la presencia del alelo G incrementaba el riesgo de dependencia a diversas sustancias, incluyendo la dependencia a alcohol, cocaína y opiáceos. Cabe la posibilidad de que la asociación

encontrada por estos autores tuviese más relación con la dependencia de cocaína u opiáceos, y menor relevancia con respecto a la dependencia de alcohol, o bien que realmente confiriese una mayor vulnerabilidad a la dependencia de varias sustancias de abuso, tanto individualmente como de forma simultánea. Esto podría explicar las diferencias entre su trabajo y el nuestro, en el que se excluyeron los individuos con abuso de otras sustancias adictivas distintas del alcohol. También es importante señalar que nuestra muestra se compone sólo de varones, mientras que el estudio de Zuo y cols. incluye individuos de ambos sexos. Ello podría afectar a los resultados, dado que se ha comprobado ^{167, 195} la importancia del sexo como factor de confusión en la adicción a sustancias de abuso. En el caso concreto del sistema endocannabinoide endógeno, la base molecular de este fenómeno de género podría residir en la existencia en la región promotora del *CNR1* de un elemento con respuesta a estrógenos ¹⁹⁶, así como en el hecho de que estas hormonas modulan la expresión del *CNR1* ¹⁹⁷. También existen diferencias muy significativas en cuanto a la distribución de los alelos de los polimorfismos del *CNR1* entre grupos étnicos distintos, lo que podría contribuir a obtener resultados dispares ¹⁶³.

Finalmente, es importante tener en cuenta que el efecto de este polimorfismo no es conocido en la actualidad, y es considerado una mutación silente, lo cual dificulta todavía más la interpretación de los resultados comentados en este epígrafe.

Polimorfismo rs806368

El análisis del polimorfismo rs806368 del *CNR1* tampoco mostró en nuestro estudio diferencias en cuanto a la frecuencia de los genotipos o los alelos en los pacientes con abuso o dependencia de alcohol al compararlos con controles sanos, lo que concuerda con estudios previos ¹⁵⁹; en nuestro conocimiento, no se han publicado trabajos en pacientes con dependencia alcohólica en los que se haya encontrado una asociación significativa con el citado polimorfismo. En el estudio de Zuo y cols ¹⁶⁷, ya mencionado en esta discusión, tampoco se encontró una asociación de la distribución de este polimorfismo de forma individual con la presencia de abuso o dependencia de alcohol. Pero, como ya se indicó en el epígrafe anterior, estos autores observaron que la presencia del genotipo TT de este polimorfismo, combinado con el alelo G (genotipos GG o TG) del polimorfismo rs6454674 de ese mismo gen, podría ser un factor de riesgo para la dependencia a sustancias, tanto alcohol como cocaína y heroína. El riesgo, por tanto, podría deberse a la interacción de las dos variantes genéticas y no al efecto individual de un polimorfismo concreto.

Este polimorfismo del gen *CNR1*, al igual que los otros dos analizados en nuestro estudio, es una mutación silente, por lo que se desconoce su significado funcional sobre el receptor CB1.

Estudio de los haplotipos del CNR1

Aunque en nuestro trabajo el análisis de los polimorfismos de forma independiente no arrojó resultados concluyentes, el estudio llevado a cabo sobre haplotipos constituidos por esas variantes alélicas sí apunta hacia una asociación de estos polimorfismos estudiados del *CNR1* con el alcoholismo. En concreto, al ser comparados con los resultados obtenidos en pacientes con abuso de alcohol, se observó una asociación de ciertos haplotipos con la presencia de dependencia alcohólica; esta asociación no se constató cuando se compararon en conjunto todos los pacientes alcohólicos, por un lado, y los controles, por otro lado. En ese sentido, identificamos 6 haplotipos con una frecuencia superior al 1% en cada grupo, y dos de ellos, los haplotipos GGT y TGC (correspondientes a los polimorfismos rs6454674-rs1049353-rs806368, por este orden) fueron significativamente más frecuentes en pacientes con dependencia alcohólica que en individuos con abuso de alcohol. Por otra parte, el haplotipo de referencia TGT fue significativamente más frecuente en sujetos con abuso de alcohol que en los individuos que presentaban dependencia alcohólica. Considerando conjuntamente los resultados de ambos análisis, se puede concluir que los pacientes alcohólicos con el haplotipo TGT son menos propensos a desarrollar dependencia al alcohol que los alcohólicos con una sustitución G por T del primer polimorfismo, o una sustitución de C por T en el tercero (haplotipos GGT y TGC). Los pacientes alcohólicos con estos haplotipos es más probable que desarrollen dependencia de alcohol, de acuerdo a los resultados de nuestro estudio.

Este resultado es compatible con los de otros análisis de haplotipos del *CNR1* previamente publicados, correspondientes a pacientes con adicción a sustancias. Entre ellos, destaca el realizado por Zuo y cols. en 2007¹⁶⁷, en el se constató que un haplotipo que contenía el alelo G del polimorfismo rs6454674 y el alelo T de rs806368 se asociaba con la dependencia de alcohol. En la dependencia a otras sustancias, Zhang y cols.¹⁵⁹ encontraron que el haplotipo TAG, formado por los alelos T del rs806379, A del rs1535255 y el alelo G del rs202393, era más frecuente en individuos con abuso de sustancias que en controles. Otros análisis de haplotipos de variantes del *CNR1* han mostrado una asociación entre estos y la dependencia a cannabis¹⁹⁸, cocaína¹⁷¹ o nicotina¹⁹⁵.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio de asociación que analiza los polimorfismos del *CNR1* comparando pacientes con dependencia al alcohol y

pacientes con abuso de alcohol sin síntomas de dependencia y resulta difícil explicar, a la luz del conocimiento actual, por qué hemos encontrado que la presencia de determinadas variantes genéticas únicamente confiere un riesgo para el desarrollo de dependencia frente a abuso, pero no para el desarrollo de alcoholismo al comparar pacientes alcohólicos frente a controles. La ausencia de un efecto funcional claro de los polimorfismos analizados hace todavía más difícil el poder establecer hipótesis que expliquen este resultado. En todo caso, considerando que los sujetos sanos pueden no haber desarrollado dependencia al alcohol por no haber estado expuestos al etanol, la inclusión de grandes bebedores con abuso de alcohol, pero sin síntomas de dependencia, puede teóricamente permitir el estudio de la asociación directa entre los diferentes marcadores genéticos y el fenotipo de dependencia alcohólica.

VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS ENCONTRADOS

Nuestro trabajo supone el análisis más extenso realizado sobre la implicación de variantes genéticas en los sistemas opioide y endocannabinoide en población europea. Respecto a los polimorfismos analizados del sistema opioide, nuestro estudio apoya la asociación del alelo G del polimorfismo A118G (rs1799971) del *OPRM1*, así como de un haplotipo de este gen en el que se incluye este alelo, como factor protector para el desarrollo de alcoholismo. Sin embargo, existe una gran controversia en cuanto a la asociación de ese alelo con la enfermedad alcohólica, relación que probablemente sea difícil de esclarecer con la metodología de los estudios genéticos de asociación habituales. Así, es probable que el efecto real de este polimorfismo esté modulado por la interacción con otras variantes genéticas o con factores ambientales, aspectos muy difíciles de valorar en nuestro trabajo. Nuestros resultados también apoyan la implicación del *OPRD1* con el alcoholismo, aunque en este caso existen muchos menos trabajos previos que para el *OPRM1*, por lo que tampoco es posible extraer conclusiones definitivas. De nuestro trabajo y de la revisión realizada de la literatura no se desprenden datos sugerentes de que el resto de variantes genéticas del sistema opioide estudiadas estén asociadas con el alcoholismo.

Respecto al análisis del sistema endocannabinoide, nuestro trabajo confirma resultados previos que muestran una asociación de determinados haplotipos del *CNR1* con alcoholismo, en concreto con la dependencia alcohólica. Aunque a partir de nuestros hallazgos no es posible esclarecer los mecanismos concretos que expliquen esta asociación, los resultados obtenidos refuerzan la implicación de este gen y de este circuito de neurotransmisión en la dependencia al alcohol.

CONCLUSIONES

En nuestro trabajo se estudiaron 16 polimorfismos localizados en 6 genes pertenecientes a los sistemas opioide y endocannabinoide, involucrados en la fisiopatología de la dependencia alcohólica. Las conclusiones fundamentales del estudio son las siguientes:

1. El genotipo AA del polimorfismo rs1799971 (A118G) del gen *OPRM1* fue más frecuente en pacientes con abuso o dependencia de alcohol que en controles, por lo que su presencia podría ser un factor de riesgo de alcoholismo.

2. Los polimorfismos analizados en el gen *OPRD1* no mostraron asociación de forma individual con la dependencia o abuso de alcohol. Sin embargo, sí se encontró una presencia significativamente mayor de un determinado haplotipo de este gen en los individuos controles sanos, por lo que podría ejercer un posible papel protector para el desarrollo de alcoholismo.

3. No se halló evidencia de la participación en la dependencia o abuso de alcohol de los tres polimorfismos analizados de los genes *OPRL1* y *PNOC*.

4. Los cuatro polimorfismos estudiados del gen *OPRK1*, analizados tanto de forma individual como mediante análisis de haplotipos, no mostraron asociación con la predisposición genética a la dependencia o abuso de alcohol.

5. No se encontró evidencia de la implicación individual en el alcoholismo de las tres variantes genéticas localizadas en el gen *CNR1*. Sin embargo, el análisis haplotípico de dichas variantes alélicas sí apoyó una asociación entre la presencia de ciertos haplotipos del gen *CNR1* y el desarrollo de dependencia alcohólica frente al abuso de alcohol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coromines J. Breve diccionario etimológico de la lengua castellana. Gredos. 3º Ed. Madrid, 1973.
2. Peñín J. Historia del vino. Ed. Espasa-Calpe. Madrid, 2008;25.
3. Ibíd., p. 36-66.
- .
4. Ibíd., p. 141-142.
- .
5. Schivelbusch W. Historia de los estimulantes. Ed. Anagrama. Barcelona, 1995;46-50.
6. Ibíd., p. 179.
7. Usó JC. El Abstemio y la «Liga Antialcohólica Española» (1910-1915): Una cruzada frustrada. *Revista del Ateneo de Castellón* 1996;9:17-24.
8. Diccionario Enciclopédico Salvat Universal. Ed. Salvat. 16º Edición, 1989, Barcelona. Volumen 20;377.
9. Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). World Health Organization. [consultado 5-01-2014] Disponible en:
<http://www.who.int/gho/alcohol/en/index.html>.
10. Framework for alcohol policy in the WHO European Region, 2006. World Health Organization. [consultado 5-01-2014]. Disponible en:
http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/79396/E88335.pdf
11. Patrones de mortalidad en España, 2008. Información y estadísticas sanitarias 2011. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. [consultado 5-01-2014] Disponible en:
http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/Patrones_de_Mortalidad_en_Espana_2008.pdf.

12. Encuesta sobre alcohol y drogas en población general en España EDADES 2011-2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [consultado 5-01-2014] Disponible en:
<http://www.pnsd.mspsi.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>
13. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research. Geneva: World Health Organization; 1993. [consultado 5-01-2014]. Disponible en:
<http://www.who.int/classifications/icd/en/GRNBOOK.pdf>
14. Gual A, Martos AR, Lligona A, Llopis JJ. Does the concept of a standard drink apply to viticultural societies? *Alcohol Alcohol* 1999;34:153-60.
15. DSM-IV TR: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Barcelona: Masson; 2001
16. DSM-5. American Psychiatric Association. Disponible en:
<http://www.dsm5.org/ProposedRevision/Pages/SubstanceUseandAddictiveDisorders.aspx>.
17. Gual A, Contel M, Segura L, Ribas A, Colom J. [The ISCA (Systematic Interview of Alcohol Consumption), a new instrument to detect risky drinking]. *Med Clin (Barc)* 2001;117:685-9.
18. Gual A, Segura L, Contel M, Heather N, Colom J. Audit-3 and audit-4: effectiveness of two short forms of the alcohol use disorders identification test. *Alcohol Alcohol* 2002;37:591-6.
19. Aragón C, Miquel M, Correa M, Sanchís-Segura C. Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones* 2002, 14 supl 1.
20. Casier H, Polet H. The metabolism of ethyl alcohol and acetaldehyde labeled with C14. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1959;120:498-501.
21. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:991-1007.

22. Koechling UM, Amit Z. Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on brain catalase in the mediation of ethanol consumption in mice. *Alcohol* 1994;11:235-9.
23. Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257:59-84.
24. Salmela KS, Kaihovaara P, Salaspuro M, Roine RP. Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1011-5.
25. DeMaster EG, Redfern B, Shirota FN, Nagasawa HT. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem Pharmacol* 1986;35:2081-5.
26. Cohen G, Sinet PM, Heikkila R. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1980;4:366-70.
27. Mogelson S, Lange LG. Nonoxidative ethanol metabolism in rabbit myocardium: purification to homogeneity of fatty acyl ethyl ester synthase. *Biochemistry* 1984;23:4075-81.
28. Zimatkin SM, Deitrich RA. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:1300-6.
29. Chamorro AJ, Marcos-Martin M, Martin-Polo J, Garcia-Diez LC, Luna G. Wernicke encephalopathy in alcoholics with diabetic ketoacidosis. *Intern Med* 2009;48:1187-9.
30. Koike H, Sobue G. Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 2006;19:481-6.
31. O'Shea RS, Dasarthy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2010;105:14-32; quiz 3.
32. Roerecke M, Rehm J. Alcohol intake revisited: risks and benefits. *Curr Atheroscler Rep* 2012;14:556-62.
33. Fernandez-Sola J, Junyent JM, Urbano-Marquez A. Alcoholic myopathies. *Curr Opin Neurol* 1996;9:400-5.

34. Nutt D. Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry* 1999;175:114-9.
35. Lobo IA, Harris RA. GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90:90-4.
36. Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:998-1040.
37. Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW. Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Mol Pharmacol* 2003;63:53-64.
38. Besheer J, Lepoutre V, Hodge CW. GABA(B) receptor agonists reduce operant ethanol self-administration and enhance ethanol sedation in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174:358-66.
39. Colombo G, Addolorato G, Agabio R, Carai MA, Pibiri F, Serra S, et al. Role of GABA(B) receptor in alcohol dependence: reducing effect of baclofen on alcohol intake and alcohol motivational properties in rats and amelioration of alcohol withdrawal syndrome and alcohol craving in human alcoholics. *Neurotox Res* 2004;6:403-14.
40. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998;54:581-618.
41. Moykkynen T, Korpi ER. Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;111:4-13.
42. Smothers CT, Woodward JJ. Effects of amino acid substitutions in transmembrane domains of the NR1 subunit on the ethanol inhibition of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:523-30.
43. Zhu W, Bie B, Pan ZZ. Involvement of non-NMDA glutamate receptors in central amygdala in synaptic actions of ethanol and ethanol-induced reward behavior. *J Neurosci* 2007;27:289-98.

44. Puglia MP, Valenzuela CF. Ethanol acutely inhibits ionotropic glutamate receptor-mediated responses and long-term potentiation in the developing CA1 hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:594-606.
45. Lack AK, Ariwodola OJ, Chappell AM, Weiner JL, McCool BA. Ethanol inhibition of kainate receptor-mediated excitatory neurotransmission in the rat basolateral nucleus of the amygdala. *Neuropharmacology* 2008;55:661-8.
46. Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 2003;99:79-94.
47. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5274-8.
48. Harris GC, Aston-Jones G. Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature* 1994;371:155-7.
49. Heinz A, Schmidt K, Baum SS, Kuhn S, Dufeu P, Schmidt LG, et al. Influence of dopaminergic transmission on severity of withdrawal syndrome in alcoholism. *J Stud Alcohol* 1996;57:471-4.
50. Goeders NE, Dworkin SI, Smith JE. Neuropharmacological assessment of cocaine self-administration into the medial prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1429-40.
51. Kohnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol* 2008;75:160-77.
52. Peters DH, Faulds D. Tiapride. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of alcohol dependence syndrome. *Drugs* 1994;47:1010-32.
53. Kieffer BL. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol* 1995;15:615-35.

54. Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, et al. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol* 1994;345:46-68.
55. Zhang H, Luo X, Kranzler HR, Lappalainen J, Yang BZ, Krupitsky E, et al. Association between two mu-opioid receptor gene (OPRM1) haplotype blocks and drug or alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 2006;15:807-19.
56. Devine DP, Leone P, Pocock D, Wise RA. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:1236-46.
57. Benjamin D, Grant ER, Pohorecky LA. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res* 1993;621:137-40.
58. Gianoulakis C. Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. *Alcohol Alcohol Suppl* 1996;1:33-42.
59. Siviy SM, Calcagnetti DJ, Reid LD. A temporal analysis of naloxone's suppressant effect on drinking. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;16:173-5.
60. Srisurapanont M, Jarusuraisin N. Naltrexone for the treatment of alcoholism: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005;8:267-80.
61. Murphy NP, Ly HT, Maidment NT. Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience* 1996;75:1-4.
62. Roberto M, Siggins GR. Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9715-20.

63. Ueda H, Yamaguchi T, Tokuyama S, Inoue M, Nishi M, Takeshima H. Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neurosci Lett* 1997;237:136-8.
64. Martin-Fardon R, Ciccocioppo R, Massi M, Weiss F. Nociceptin prevents stress-induced ethanol- but not cocaine-seeking behavior in rats. *Neuroreport* 2000;11:1939-43.
65. Kuzmin A, Kreek MJ, Bakalkin G, Liljequist S. The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist Ro 64-6198 reduces alcohol self-administration and prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:902-10.
66. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4.
67. Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 1993;327:535-50.
68. Gurwitz D, Kloog Y. Do endogenous cannabinoids contribute to HIV-mediated immune failure? *Mol Med Today* 1998;4:196-200.
69. Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 2006;29:225-32.
70. Hungund BL, Basavarajappa BS. Role of endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptors in alcohol-related behaviors. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025:515-27.
71. De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, et al. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 2001;7:1151-4.
72. De Vries TJ, Schoffelmeer AN. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:420-6.
73. Racz I, Bilkei-Gorzo A, Toth ZE, Michel K, Palkovits M, Zimmer A. A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking. *J Neurosci* 2003;23:2453-8.

74. Kranzler HR, Anton RF. Implications of recent neuropsychopharmacologic research for understanding the etiology and development of alcoholism. *J Consult Clin Psychol* 1994;62:1116-26.
75. Naranjo CA, Bremner KE. Serotonin-altering medications and desire, consumption and effects of alcohol-treatment implications. *EXS* 1994;71:209-19.
76. Kiefer F, Mann K. New achievements and pharmacotherapeutic approaches in the treatment of alcohol dependence. *Eur J Pharmacol* 2005;526:163-71.
77. Soderpalm B, Ericson M, Olausson P, Blomqvist O, Engel JA. Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behav Brain Res* 2000;113:85-96.
78. Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J Neurochem* 1997;68:121-7.
79. Cadete-Leite A, Brandao F, Andrade JP, Ribeiro-da-Silva A, Paula-Barbosa MM. The GABAergic system of the dentate gyrus after withdrawal from chronic alcohol consumption: effects of intracerebral grafting and putative neuroprotective agents. *Alcohol Alcohol* 1997;32:471-84.
80. Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 1996;16:909-12.
81. Pérez-Rial S OS, Manzanares J. Neurobiología de la dependencia alcohólica. *Trastornos adictivos* 2003,5(1):4-12.
82. Mann K, Leher P, Morgan MY. The efficacy of acamprosate in the maintenance of abstinence in alcohol-dependent individuals: results of a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:51-63.
83. Koob GF. Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 1996;16:893-6.

84. Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49:876-80.
85. Little HJ. The contribution of electrophysiology to knowledge of the acute and chronic effects of ethanol. *Pharmacol Ther* 1999;84:333-53.
86. McBride WJ, Bodart B, Lumeng L, Li TK. Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:1420-2.
87. Gardner EL. Brain reward mechanisms. En Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG (eds) *Substance abuse: a comprehensive textbook*, Williams & Wilkins (Baltimore), 1997, pp: 51-85.
88. Anton RF. Naltrexone for the management of alcohol dependence. *N Engl J Med* 2008;359:715-21.
89. Cotton NS. The familial incidence of alcoholism: a review. *J Stud Alcohol* 1979;40:89-116.
90. Heath AC. Genetic influences on drinking behavior en humans iTGoABH, Kissin B eds), pp 82-121. 1995. Oxford University Press, New York.
91. Belknap JK, Atkins AL. The replicability of QTLs for murine alcohol preference drinking behavior across eight independent studies. *Mamm Genome* 2001;12:893-9.
92. Whatley VJ, Johnson TE, Erwin VG. Identification and confirmation of quantitative trait loci regulating alcohol consumption in congenic strains of mice. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1262-71.
93. Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 2008;29:1306-11.
94. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:489-99.

95. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 1998;316:1236-8.
96. Ray LA, Hutchison KE. A polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) and sensitivity to the effects of alcohol in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1789-95.
97. Uhl GR, Sora I, Wang Z. The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7752-5.
98. Ikeda K, Ide S, Han W, Hayashida M, Uhl GR, Sora I. How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:311-7.
99. Ravindranathan A, Joslyn G, Robertson M, Schuckit MA, Whistler JL, White RL. Functional characterization of human variants of the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:10811-6.
100. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 1996;383:819-23.
101. Roth-Deri I, Zangen A, Aleli M, Goelman RG, Pelled G, Nakash R, et al. Effect of experimenter-delivered and self-administered cocaine on extracellular beta-endorphin levels in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 2003;84:930-8.
102. Rosin A, Kitchen I, Georgieva J. Effects of single and dual administration of cocaine and ethanol on opioid and ORL1 receptor expression in rat CNS: an autoradiographic study. *Brain Res* 2003;978:1-13.
103. O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49:881-7.
104. Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 1997;2:490-4.

105. Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9608-13.
106. Befort K, Filliol D, Decaillet FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL. A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling. *J Biol Chem* 2001;276:3130-7.
107. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem* 2005;280:32618-24.
108. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the mu-opioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 2006;83:262-8.
109. Bart G, Heilig M, LaForge KS, Pollak L, Leal SM, Ott J, et al. Substantial attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with heroin addiction in central Sweden. *Mol Psychiatry* 2004;9:547-9.
110. Bart G, Kreek MJ, Ott J, LaForge KS, Proudnikov D, Pollak L, et al. Increased attributable risk related to a functional mu-opioid receptor gene polymorphism in association with alcohol dependence in central Sweden. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:417-22.
111. Kim SG, Kim CM, Kang DH, Kim YJ, Byun WT, Kim SY, et al. Association of functional opioid receptor genotypes with alcohol dependence in Koreans. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:986-90.
112. Szeto CY, Tang NL, Lee DT, Stadlin A. Association between mu opioid receptor gene polymorphisms and Chinese heroin addicts. *Neuroreport* 2001;12:1103-6.
113. 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.

114. Tan EC, Tan CH, Karupathivan U, Yap EP. Mu opioid receptor gene polymorphisms and heroin dependence in Asian populations. *Neuroreport* 2003;14:569-72.
115. Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, Gottheil E, DeMaria PA, Jr., O'Brien CP, et al. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence. *Psychiatr Genet* 2003;13:169-73.
116. Franke P, Wang T, Nothen MM, Knapp M, Neidt H, Albrecht S, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet* 2001;105:114-9.
117. Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 1999;4:476-83.
118. Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet* 2000;9:2895-908.
119. Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, et al. Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025:316-24.
120. Kim SA, Kim JW, Song JY, Park S, Lee HJ, Chung JH. Association of polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene (CHRNA4), mu-opioid receptor gene (OPRM1), and ethanol-metabolizing enzyme genes with alcoholism in Korean patients. *Alcohol* 2004;34:115-20.
121. Li T, Liu X, Zhu ZH, Zhao J, Hu X, Sham PC, et al. Association analysis of polymorphisms in the mu opioid gene and heroin abuse in Chinese subjects. *Addict Biol* 2000;5:181-6.
122. Luo X, Kranzler HR, Zhao H, Gelernter J. Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003;120B:97-108.

123. Sander T, Gscheidel N, Wendel B, Samochowiec J, Smolka M, Rommelspacher H, et al. Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:2108-10.
124. 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. *Hum Mutat* 2002;19:459-60.
125. Loh el W, Fann CS, Chang YT, Chang CJ, Cheng AT. Endogenous opioid receptor genes and alcohol dependence among Taiwanese Han. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:15-9.
126. Oroszi G, Anton RF, O'Malley S, Swift R, Pettinati H, Couper D, et al. OPRM1 Asn40Asp predicts response to naltrexone treatment: a haplotype-based approach. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:383-93.
127. Oslin DW, Berrettini W, Kranzler HR, Pettinati H, Gelernter J, Volpicelli JR, et al. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1546-52.
128. Anton RF, Oroszi G, O'Malley S, Couper D, Swift R, Pettinati H, et al. An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the Combined Pharmacotherapies and Behavioral Interventions for Alcohol Dependence (COMBINE) study. *Arch Gen Psychiatry* 2008;65:135-44.
129. Gelernter J, Gueorguieva R, Kranzler HR, Zhang H, Cramer J, Rosenheck R, et al. Opioid receptor gene (OPRM1, OPRK1, and OPRD1) variants and response to naltrexone treatment for alcohol dependence: results from the VA Cooperative Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:555-63.
130. Mitchell JM, Fields HL, White RL, Meadoff TM, Joslyn G, Rowbotham MC. The Asp40 mu-opioid receptor allele does not predict naltrexone treatment efficacy in heavy drinkers. *J Clin Psychopharmacol* 2007;27:112-5.

131. Chamorro AJ, Marcos M, Miron-Canelo JA, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. Association of micro-opioid receptor (OPRM1) gene polymorphism with response to naltrexone in alcohol dependence: a systematic review and meta-analysis. *Addict Biol* 2012;17:505-12.
132. Arias AJ, Armeli S, Gelernter J, Covault J, Kallio A, Karhuvaara S, et al. Effects of opioid receptor gene variation on targeted nalmefene treatment in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:1159-66.
133. Pratt WM, Davidson D. Role of the HPA axis and the A118G polymorphism of the mu-opioid receptor in stress-induced drinking behavior. *Alcohol Alcohol* 2009;44:358-65.
134. Rommelspacher H, Smolka M, Schmidt LG, Samochowiec J, Hoehe MR. Genetic analysis of the mu-opioid receptor in alcohol-dependent individuals. *Alcohol* 2001;24:129-35.
135. Crystal HA, Hamon S, Randesi M, Cook J, Anastos K, Lazar J, et al. A C17T polymorphism in the mu opiate receptor is associated with quantitative measures of drug use in African American women. *Addict Biol* 2012;17:181-91.
136. Kranzler HR, Gelernter J, O'Malley S, Hernandez-Avila CA, Kaufman D. Association of alcohol or other drug dependence with alleles of the mu opioid receptor gene (OPRM1). *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1359-62.
137. Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, et al. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* 1999;24:243-52.
138. Zhang H, Gelernter J, Gruen JR, Kranzler HR, Herman AI, Simen AA. Functional impact of a single-nucleotide polymorphism in the OPRD1 promoter region. *J Hum Genet* 2010;55:278-84.
139. Levran O, Londono D, O'Hara K, Nielsen DA, Peles E, Rotrosen J, et al. Genetic susceptibility to heroin addiction: a candidate gene association study. *Genes Brain Behav* 2008;7:720-9.

140. Nelson EC, Lynskey MT, Heath AC, Wray N, Agrawal A, Shand FL, et al. Association of OPRD1 polymorphisms with heroin dependence in a large case-control series. *Addict Biol* 2014; 19:111-21.
141. Mayer P, Rochlitz H, Rauch E, Rommelspacher H, Hasse HE, Schmidt S, et al. Association between a delta opioid receptor gene polymorphism and heroin dependence in man. *Neuroreport* 1997;8:2547-50.
142. Zhang H, Kranzler HR, Yang BZ, Luo X, Gelernter J. The OPRD1 and OPRK1 loci in alcohol or drug dependence: OPRD1 variation modulates substance dependence risk. *Mol Psychiatry* 2008;13:531-43.
143. Franke P, Nothen MM, Wang T, Neidt H, Knapp M, Lichtermann D, et al. Human delta-opioid receptor gene and susceptibility to heroin and alcohol dependence. *Am J Med Genet* 1999;88:462-4.
144. Xu K, Liu XH, Nagarajan S, Gu XY, Goldman D. Relationship of the delta-opioid receptor gene to heroin abuse in a large Chinese case/control sample. *Am J Med Genet* 2002;110:45-50.
145. Mollereau C, Mouldous L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 2000;21:907-17.
146. Xuei X, Flury-Wetherill L, Almasy L, Bierut L, Tischfield J, Schuckit M, et al. Association analysis of genes encoding the nociceptin receptor (OPRL1) and its endogenous ligand (PNOC) with alcohol or illicit drug dependence. *Addict Biol* 2008;13:80-7.
147. Huang J, Young B, Pletcher MT, Heilig M, Wahlestedt C. Association between the nociceptin receptor gene (OPRL1) single nucleotide polymorphisms and alcohol dependence. *Addict Biol* 2008;13:88-94.
148. Briant JA, Nielsen DA, Proudnikov D, Londono D, Ho A, Ott J, et al. Evidence for association of two variants of the nociceptin/orphanin FQ receptor gene OPRL1 with vulnerability to develop opiate addiction in Caucasians. *Psychiatr Genet* 2010;20:65-72.

149. Yuferov V, Fussell D, LaForge KS, Nielsen DA, Gordon D, Ho A, et al. Redefinition of the human kappa opioid receptor gene (OPRK1) structure and association of haplotypes with opiate addiction. *Pharmacogenetics* 2004;14:793-804.
150. Lindholm S, Werme M, Brene S, Franck J. The selective kappa-opioid receptor agonist U50,488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat. *Behav Brain Res* 2001;120:137-46.
151. Shippenberg TS, Chefer VI, Zapata A, Heidbreder CA. Modulation of the behavioral and neurochemical effects of psychostimulants by kappa-opioid receptor systems. *Ann N Y Acad Sci* 2001;937:50-73.
152. Beadles-Bohling AS, Wiren KM. Anticonvulsive effects of kappa-opioid receptor modulation in an animal model of ethanol withdrawal. *Genes Brain Behav* 2006;5:483-96.
153. Edenberg HJ, Wang J, Tian H, Pochareddy S, Xuei X, Wetherill L, et al. A regulatory variation in OPRK1, the gene encoding the kappa-opioid receptor, is associated with alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 2008;17:1783-9.
154. Gerra G, Leonardi C, Cortese E, D'Amore A, Lucchini A, Strepparola G, et al. Human kappa opioid receptor gene (OPRK1) polymorphism is associated with opiate addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B:771-5.
155. Xuei X, Dick D, Flury-Wetherill L, Tian HJ, Agrawal A, Bierut L, et al. Association of the kappa-opioid system with alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 2006;11:1016-24.
156. Luo X, Zuo L, Kranzler H, Zhang H, Wang S, Gelernter J. Multiple OPR genes influence personality traits in substance dependent and healthy subjects in two American populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:1028-39.
157. Kumar D, Chakraborty J, Das S. Epistatic effects between variants of kappa-opioid receptor gene and A118G of mu-opioid receptor gene increase susceptibility to addiction in Indian population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;36:225-30.

158. Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, et al. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol* 1991;3:880-5.
159. Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, et al. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 2004;9:916-31.
160. Martinez-Gras I, Hoenicka J, Ponce G, Rodriguez-Jimenez R, Jimenez-Arriero MA, Perez-Hernandez E, et al. (AAT)_n repeat in the cannabinoid receptor gene, CNR1: association with schizophrenia in a Spanish population. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006;256:437-41.
161. Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G, et al. Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry* 1997;2:161-8.
162. Johnson JP, Muhleman D, MacMurray J, Gade R, Verde R, Ask M, et al. Association between the cannabinoid receptor gene (CNR1) and the P300 event-related potential. *Mol Psychiatry* 1997;2:169-71.
163. Li T, Liu X, Zhu ZH, Zhao J, Hu X, Ball DM, et al. No association between (AAT)_n repeats in the cannabinoid receptor gene (CNR1) and heroin abuse in a Chinese population. *Mol Psychiatry* 2000;5:128-30.
164. Covault J, Gelernter J, Kranzler H. Association study of cannabinoid receptor gene (CNR1) alleles and drug dependence. *Mol Psychiatry* 2001;6:501-2.
165. Heller D, Schneider U, Seifert J, Cimander KF, Stuhmann M. The cannabinoid receptor gene (CNR1) is not affected in German i.v. drug users. *Addict Biol* 2001;6:183-7.
166. Schmidt LG, Samochowiec J, Finckh U, Fiszer-Piosik E, Horodnicki J, Wendel B, et al. Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 2002;65:221-4.

167. Zuo L, Kranzler HR, Luo X, Covault J, Gelernter J. CNR1 variation modulates risk for drug and alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 2007;62:616-26.
168. Preuss UW, Koller G, Zill P, Bondy B, Soyka M. Alcoholism-related phenotypes and genetic variants of the CB1 receptor. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2003;253:275-80.
169. Herman AI, Kranzler HR, Cubells JF, Gelernter J, Covault J. Association study of the CNR1 gene exon 3 alternative promoter region polymorphisms and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B:499-503.
170. Benyamina A, Kebir O, Blecha L, Reynaud M, Krebs MO. CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict Biol* 2011;16:1-6.
171. Zuo L, Kranzler HR, Luo X, Yang BZ, Weiss R, Brady K, et al. Interaction between two independent CNR1 variants increases risk for cocaine dependence in European Americans: a replication study in family-based sample and population-based sample. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:1504-13.
172. Costa J. [Real-time PCR]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:299-304; quiz 5.
173. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
174. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 2004;53:793-808.
175. Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2004;68:165-77.
176. Tregouet DA, Ducimetiere P, Tiret L. Testing association between candidate-gene markers and phenotype in related individuals, by use of estimating equations. *Am J Hum Genet* 1997;61:189-99.

177. Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998;19:589-601.
178. Ehlers CL, Lind PA, Wilhelmsen KC. Association between single nucleotide polymorphisms in the mu opioid receptor gene (OPRM1) and self-reported responses to alcohol in American Indians. *BMC Med Genet* 2008;9:35.
179. Xuei X, Flury-Wetherill L, Bierut L, Dick D, Nurnberger J, Jr., Foroud T, et al. The opioid system in alcohol and drug dependence: family-based association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B:877-84.
180. Smith RJ, Doyle GA, Han AM, Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, et al. Novel exonic mu-opioid receptor gene (OPRM1) polymorphisms not associated with opioid dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;133B:105-9.
181. Kim H, Mittal DP, Iadarola MJ, Dionne RA. Genetic predictors for acute experimental cold and heat pain sensitivity in humans. *J Med Genet* 2006;43:e40.
182. Xu X, Wang H, Zhu M, Sun Y, Tao Y, He Q, et al. Next-generation DNA sequencing-based assay for measuring allelic expression imbalance (AEI) of candidate neuropsychiatric disorder genes in human brain. *BMC Genomics* 2011;12:518.
183. Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, Pfennig S, Ochsenkuhn T, Goke B, et al. The cannabinoid 1 receptor (CNR1) 1359 G/A polymorphism modulates susceptibility to ulcerative colitis and the phenotype in Crohn's disease. *PLoS One* 2010;5:e9453.
184. Kranzler HR, Edenberg HJ. Pharmacogenetics of alcohol and alcohol dependence treatment. *Curr Pharm Des* 2010;16:2141-8.
185. Neale, B.M. and P.C. Sham, *The future of association studies: gene-based analysis and replication*. *Am J Hum Genet* 2004. 75(3): p. 353-62.
186. Town T, Abdullah L, Crawford F, Schinka J, Ordorica PI, Francis E, et al. Association of a functional mu-opioid receptor allele (+118A) with alcohol dependency. *Am J Med Genet* 1999;88:458-61.

187. Lerman C, Wileyto EP, Patterson F, Rukstalis M, Audrain-McGovern J, Restine S, et al. The functional mu opioid receptor (OPRM1) Asn40Asp variant predicts short-term response to nicotine replacement therapy in a clinical trial. *Pharmacogenomics J* 2004;4:184-92.
188. Kim SG. Gender differences in the genetic risk for alcohol dependence--the results of a pharmacogenetic study in Korean alcoholics. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 2009;44:680-5.
189. Beyer A, Koch T, Schroder H, Schulz S, Hollt V. Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor. *J Neurochem* 2004;89:553-60.
190. Ashenhurst JR, Bujarski S, Ray LA. Delta and kappa opioid receptor polymorphisms influence the effects of naltrexone on subjective responses to alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 2012;103:253-9.
191. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003;12:205-16.
192. Hartman CA, Hopper CJ, Haberstick B, Rhee SH, Crowley TJ, Corley RP, et al. The association between cannabinoid receptor 1 gene (CNR1) and cannabis dependence symptoms in adolescents and young adults. *Drug Alcohol Depend* 2009;104:11-6.
193. Gadzicki D, Muller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Mol Cell Probes* 1999;13:321-3.
194. Ujike H, Takaki M, Nakata K, Tanaka Y, Takeda T, Kodama M, et al. CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002;7:515-8.

195. Chen X, Williamson VS, An SS, Hetteima JM, Aggen SH, Neale MC, et al. Cannabinoid receptor 1 gene association with nicotine dependence. *Arch Gen Psychiatry* 2008;65:816-24.
196. Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, et al. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 2004;18:1411-27.
197. Gonzalez S, Mauriello-Romanazzi G, Berrendero F, Ramos JA, Franzoni MF, Fernandez-Ruiz J. Decreased cannabinoid CB1 receptor mRNA levels and immunoreactivity in pituitary hyperplasia induced by prolonged exposure to estrogens. *Pituitary* 2000;3:221-6.
198. Agrawal A, Wetherill L, Dick DM, Xuei X, Hinrichs A, Hesselbrock V, et al. Evidence for association between polymorphisms in the cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene and cannabis dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009;150B:736-40.
199. Hopfer CJ, Young SE, Purcell S, Crowley TJ, Stallings MC, Corley RP, et al. Cannabis receptor haplotype associated with fewer cannabis dependence symptoms in adolescents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141B:895-901.

ANEXO I

Se adjunta separata del artículo publicado hasta la fecha como consecuencia del trabajo realizado en esta tesis doctoral:

Marcos M, Pastor I, de la Calle C, Barrio-Real L, Laso FJ, González-Sarmiento R. Cannabinoid receptor 1 gene is associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012;36(2):267-71.
doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01623.x.