



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL
2018**

**Polimorfismos
genéticos implicados
en la respuesta al
tratamiento de
deshabitación
tabáquica**

ESTER LASO LUCAS

Unidad de Medicina Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca

Tesis Doctoral:

**Polimorfismos genéticos implicados en la respuesta al
tratamiento de deshabituación tabáquica**

**ESTER LASO LUCAS
2018**

Directores:

Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento
Dr. Ricardo Usategui Martín



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



El Prof. Dr. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, Catedrático del Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca.

El Dr. RICARDO USATEGUI MARTÍN, Investigador postdoctoral en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Polimorfismos genéticos implicados en la respuesta al tratamiento de deshabituación tabáquica”, que presenta la Graduada en Farmacia Ester Laso Lucas, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios, para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al **Grado de Doctor** por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el presente certificado.

En Salamanca, a 27 de Julio de 2018.

Dr. Rogelio González Sarmiento

Dr. Ricardo Usategui Martín

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI13/01741).



ÍNDICES

ÍNDICES	9
Índice de Capítulos.....	14
Índice de Figuras	14
Índice de Tablas	16

INTRODUCCIÓN.....	19
1. Tabaquismo	21
1.1 <i>Problema de salud pública</i>	21
1.2 <i>Epidemiología del consumo y mortalidad</i>	21
1.3 <i>El tabaquismo como enfermedad</i>	22
1.4 <i>Enfermedades relacionadas con el tabaquismo</i>	23
<i>Enfermedades respiratorias</i>	24
<i>Cáncer</i>	24
<i>Patología cardiovascular</i>	25
<i>Otras enfermedades</i>	25
2. Dependencia y hábito tabáquico.....	25
3. Opciones terapéuticas. Tratamientos.....	28
3.1 <i>Tratamiento cognitivo-conductual. Intervención mínima (IM)</i>	29
3.2 <i>Terapia sustitutiva con nicotina (TSN)</i>	29
<i>Parches de nicotina</i>	29
<i>Chicles, comprimidos y espray bucal</i>	30
3.3 <i>Bupropion</i>	30
3.4 <i>Vareniclina</i>	31
3.5 <i>Otros tratamientos</i>	32
<i>Vacuna antinicotina</i>	32
<i>Citisina</i>	33
<i>Naltrexona</i>	33
4. Tabaquismo y genética	33
4.1 <i>Genes relacionados con el metabolismo de la nicotina</i>	33

4.2	<i>Genes relacionados con las vías cerebrales de la adicción a la nicotina</i> ...	34
	<i>Sistema catecolaminérgico</i>	35
	<i>Sistema colinérgico</i>	36
	<i>Sistema opioide</i>	38
	<i>Sistema noradrenérgico</i>	38
	<i>Sistema serotoninérgico</i>	39
	<i>Sistema cannabinoide</i>	39
	<i>Sistema gabaérgico</i>	40
	<i>Óxido nítrico</i>	40
5.	Farmacogenética. Individualización del tratamiento.....	41
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....		43
PACIENTES Y MÉTODOS		47
1.	Pacientes.....	49
2.	Recogida de datos.....	49
3.	Extracción del DNA de sangre periférica.....	50
3.1	<i>Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.</i>	50
3.2	<i>Purificación del DNA.</i>	51
3.3	<i>Cuantificación del DNA</i>	51
4.	Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan.....	51
5.	Análisis estadístico	54
RESULTADOS		55
1.	Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes.....	57
2.	Influencia de la variabilidad de los genes OPRM1, CNR1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRN4 en el proceso de deshabituación tabáquica.	60
3.	Estudio de Farmacogenética. Influencia de la variabilidad de los genes OPRM1, CHRNA3, CHRNA5, CHRN4 y CNR en la efectividad del tratamiento utilizado.	66
3.1.	<i>Tratamiento con IM</i>	66
3.2.	<i>Tratamiento con TSN</i>	68
3.3.	<i>Tratamiento con Bupropion</i>	70

3.4. Tratamiento con Vareniclina	72
DISCUSIÓN	75
1. Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes.....	77
2. Estudios de asociación alélica de los genes OPRM1, CNR1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRN4 en el proceso de deshabituación tabáquica y en la efectividad del tratamiento utilizado.	80
3. Debilidades y perspectivas futuras de nuestro trabajo	88
CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA	93

Índice de Figuras

Figura 1: Principales enfermedades relacionadas con el tabaquismo y sus órganos afectados. Esta imagen está diseñada para informar de las consecuencias del tabaquismo y educar a los pacientes de un programa de deshabituación tabáquica...15

Figura 2: Mecanismo cerebral de la adicción a la nicotina. Influencia de la dopamina. Esta imagen está diseñada para informar de las consecuencias del tabaquismo y educar a los pacientes de un programa de deshabituación tabáquica 18

Figura 3: Circuito de recompensa en el cerebro y acciones de las diferentes drogas de abuso. En esta visión del cerebro se señala la vía dopaminérgica que se extiende desde el ATV con proyecciones al NAc y otras áreas del sistema límbico: amígdala (A), córtex prefrontal (Cx-FP), córtex medial (Cx-M), tálamo (TL), hipocampo (HP)..... 19

Figura 4: Mecanismo de acción de las vacunas antinicotina. La vacuna estimula la producción de anticuerpos específicos antinicotina. De esta forma, la nicotina no llega al cerebro y no genera placer24

Figura 5: Representación de la neurotransmisión nicotínica y sus receptores27

Figura 6: Efectos de la nicotina en la neurotransmisión dopaminérgica. La nicotina aumenta la liberación de dopamina (DA). La proteína Tirosin Hidroxilasa (TH) media la conversión de tirosina a L-dopa, paso limitante de la síntesis de DA. El transportador de dopamina (DAT) regula la cantidad de DA en la sinapsis. COMT y MAO están involucradas en su metabolismo.27

Figura 7: Estructura de los receptores neuronales de acetilcolina. (A) topología de membrana de una subunidad neuronal nAChR. Cada subunidad nAChR contiene cuatro dominios transmembrana (M1-M4), un extremo amino y carboxilo terminal extracelular, y un bucle intracelular M3-M4 prominente de longitud variable. (B) Cinco subunidades se ensamblan para formar una subunidad funcional. (C) Los

receptores homoméricos consisten solo en subunidades α y generalmente tienen baja afinidad por el agonista. Hasta la fecha, solo las subunidades de mamíferos $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (no mostradas) pueden formar homómeros funcionales. (D) La mayoría de los nAChR de alta afinidad son heteroméricos y consisten en una combinación de subunidades α y β . Es importante destacar que múltiples subunidades α pueden ensamblarse con múltiples subunidades β en el complejo pentamérico nAChR (ilustrado aquí por $\alpha 4\alpha 6\beta 3\beta 2$). Los sitios de unión ACh se representan como triángulos rojos.29

Figura 8: Representación del proceso del ensayo de expresión génica con sondas TaqMan46

Figura 9: Representación de los resultados de discriminación alélica con sondas TaqMan del polimorfismo rs16969968 del gen CHRNA5. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos GG, los rojos homocigotos AA y los verdes heterocigotos AG.47

Figura 10: Representación esquemática de la estructura genómica del bucle formado por los genes CHRNA3/A5/B4 que muestra el solapamiento cola a cola entre el gen CHRNA5 y CHRNA3. Las flechas indican la dirección de la transcripción. (CEN: centrómero, TEL: telómero).79

Índice de Tablas

Tabla 1: Polimorfismos estudiados en el presente estudio mediante discriminación alélica con sondas TaqMan.....	53
Tabla 2: Resultados de abstinencia según edad y sexo de los pacientes incluidos en nuestro estudio.....	58
Tabla 3: Abstinecias conseguidas (valor medio, en meses) con cada uno de los tratamientos.	59
Tabla 4: Edad y sexo de los pacientes en función del tratamiento empleado y el éxito del mismo.	60
Tabla 5: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en función del TF, categorizado en bajo (1-6) y alto (7-10). Los p-valores fueron ajustados por edad y sexo.	61
Tabla 6: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en función de la abstinencia conseguida a los 6 meses. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.	63
Tabla 7: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en función de la abstinencia conseguida tras 1 año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.	65
Tabla 8: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con IM en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.	67
Tabla 9: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con TSN en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.	69
Tabla 10: Distribución genotípica de de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con bupropion en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.....	71

Tabla 11: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con vareniclina en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.....73



INTRODUCCIÓN

1. Tabaquismo

1.1 Problema de salud pública

El consumo de tabaco es uno de los más importantes factores de riesgo de enfermedad y muerte. Ha causado la muerte a 100 millones de personas a lo largo del siglo XX, muchas más que las muertes que causaron conjuntamente la Primera y la Segunda Guerra Mundial (1). Es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al tabaquismo una de sus líneas prioritarias de actuación (2).

El carácter adictivo del tabaco, que radica en los efectos adictivos de la nicotina, explica las dificultades que experimentan los fumadores para dejar de fumar. Por eso, las estrategias de prevención prioritarias han de centrarse en los factores que propician el inicio del hábito tabáquico (3).

En el año 2008, el informe de la OMS sobre la epidemia del tabaco con el lema “Sin humo y con vida” tuvo como objetivo disminuir el consumo mundial de tabaco. Se estableció el plan de medidas MPOWER (*Monitor*: vigilar el consumo de tabaco y las políticas de prevención. *Protect*: proteger a la población del humo de tabaco. *Offer*: ofrecer ayuda para el abandono del tabaco. *Warn*: advertir de los peligros del tabaco. *Enforce*: hacer cumplir las prohibiciones sobre publicidad, promoción y patrocinio del tabaco. *Raise*: aumentar los impuestos al tabaco como herramienta para facilitar la aplicación del Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco) (4). Una década después los logros conseguidos han sido considerables. Casi dos tercios de los países (121 de 194; es decir, el 63% de la población mundial) han introducido al menos una medida MPOWER al máximo nivel de cumplimiento (5).

1.2 Epidemiología del consumo y mortalidad

Hoy en día fumar sigue siendo la principal causa aislada de morbilidad y de mortalidad prematura evitable en España y en todo el mundo. Según datos recientes publicados por la OMS, más de 7 millones de personas consumidoras de tabaco mueren anualmente (6). Un tercio de la población mundial mayor de 15 años es

fumadora. A nivel global se calcula que el tabaco matará hasta a la mitad de sus consumidores (7,8).

En España, las muertes anuales ascendieron a 52.000 entre 2010 y 2014 (6). El número de fumadores descendió al 22% de la población, la cifra más baja de los últimos 30 años, según la Encuesta Nacional de Salud 2017 del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. No obstante, este descenso se produce a un ritmo cada vez más lento (9). La edad de iniciación al tabaco es entorno a los 17 años, aunque la mayor proporción de fumadores tiene entre 20 y 39 años (50,2%). Un hecho de gran trascendencia en la evolución de la epidemia de tabaquismo en España es la importante reducción observada en el porcentaje de fumadores jóvenes (de 16 a 24 años). Este indicador es una medida indirecta de la iniciación al consumo de tabaco (10).

1.3 El tabaquismo como enfermedad

El consumo activo de tabaco y la inhalación pasiva de su humo son considerados, desde el punto de vista de la salud, como factores de riesgo y como las causas primera y tercera respectivamente de muertes prevenibles en los países desarrollados. En 1979 un comité de expertos de la OMS consideró al tabaquismo, por su elevado y masivo consumo, por las enfermedades que produce y por el gran número de afectados por las mismas, como la principal epidemia del siglo XX en el mundo occidental (11).

Los no fumadores que respiran el humo del tabaco también tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedades que los que no están expuestos. Poblaciones de especial riesgo son las mujeres embarazadas fumadoras, los niños fumadores pasivos y las personas con patologías orgánicas previas. Como consecuencia de todo ello, los costes sanitarios y sociales de las enfermedades producidas por el tabaquismo son muy elevados (11).

El humo del tabaco se produce al quemar un material orgánico complejo, el tabaco, junto con varios aditivos y papel, a una temperatura elevada, que alcanza casi

1000°C. Este humo contiene numerosos gases y partículas tóxicas capaces de provocar daños por inflamación, irritación, sofocación o carcinogénesis (12).

1.4 Enfermedades relacionadas con el tabaquismo

Se puede definir el tabaquismo como una enfermedad crónica, recidivante, transmitida a través de los medios de comunicación (publicidad, cine, TV) y del ámbito social, que está directamente implicada en las principales enfermedades cardiovasculares, respiratorias y tumorales. Una lista en la que recientemente han ingresado la diabetes, la tuberculosis, el cáncer de colon y recto o el carcinoma hepatocelular o el del aparato reproductor (figura1) (11).

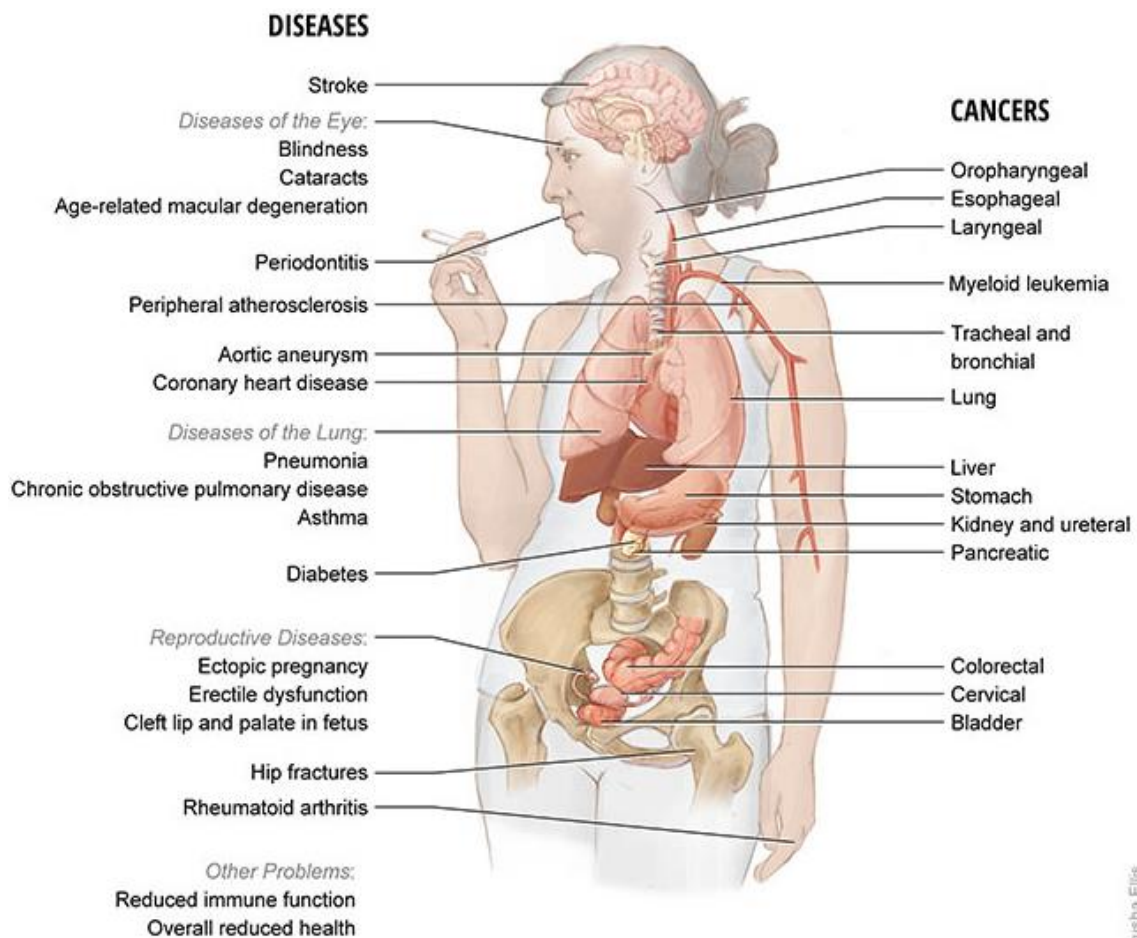


Figura 1: Principales enfermedades relacionadas con el tabaquismo y sus órganos afectados. Esta imagen está diseñada para informar de las consecuencias del tabaquismo y educar a los pacientes de un programa de deshabituación tabáquica (13).

Enfermedades respiratorias

El tabaco es factor causal de diversas enfermedades respiratorias no tumorales. La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es la de mayor prevalencia e impacto de todas las enfermedades respiratorias producidas por el tabaco. Su prevalencia y mortalidad aumentan en función de la dosis de tabaco consumido; su mortalidad está incrementada entre 3 y 17 veces en los fumadores. En España es la cuarta causa de mortalidad, con una tasa de 33 por 100.000 habitantes, que se eleva a 176 por 100.000 en mayores de 75 años. La aparición de la EPOC refleja una aceleración de la pérdida anual de función pulmonar vinculada con la edad. La caída anual del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) con la edad, es más acentuada en los fumadores (hasta 50 ml/año) que en los no fumadores (25 ml/año) (14).

El tabaco se asocia con un incremento de la hiperreactividad bronquial, existiendo en los asmáticos fumadores mayor riesgo de muerte, síntomas más graves, un descenso más acusado de la función pulmonar, mayor número de hospitalizaciones y más episodios de asma fatal (14).

Se han descrito otras enfermedades respiratorias con evidente asociación con el hábito de fumar como el síndrome de apnea del sueño (SAHS), la fibrosis pulmonar idiopática, la asbestosis, el granuloma eosinófilo, la hemorragia pulmonar, la histiocitosis X y la enfermedad pulmonar metastásica. Probablemente esta asociación pueda explicarse por la acción del tabaco sobre el sistema inmune y su capacidad para inducir lesiones celulares (14).

Cáncer

La asociación entre tabaco y cáncer comenzó en el siglo XVIII cuando aparecieron las primeras sospechas que relacionaban tumores de piel y de las vías aéreas superiores. La naturaleza carcinógena del humo de los cigarrillos, y de modo concreto del alquitrán y otras partículas, se estableció a principios del siglo pasado (14). El tabaco es responsable del 95% de los cánceres de pulmón (15). También se

ha demostrado su implicación en el cáncer de la cavidad oral, labio, faringe, laringe, esófago, estómago, vejiga, cérvix uterino, riñón, uréter y páncreas (14).

Patología cardiovascular

El tabaco es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad coronaria. Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en EE.UU así como en el conjunto de la población española. El índice de mortalidad por cardiopatía coronaria es de un 60-70% mayor en varones fumadores que en no fumadores y la muerte súbita es de 2 a 4 veces más probable en varones fumadores jóvenes que en no fumadores (14). Las enfermedades cerebrovasculares, la hipertensión (HTA), la tromboangeítis obliterante, el síndrome de Raynaud y la arterioesclerosis, son otras enfermedades vasculares cuya incidencia está aumentada en los individuos fumadores con respecto a los no fumadores (14).

Otras enfermedades

También, se ha puesto de manifiesto la relación entre el tabaco y otro grupo de enfermedades. La úlcera gastroduodenal es más frecuente en varones fumadores. Además, el tabaco retrasa la curación espontánea o inducida por fármacos de la úlcera péptica. Está demostrado que el envejecimiento cutáneo, con aparición precoz de arrugas en la piel, es más frecuente y precoz en los fumadores (“rostro del fumador”). Es característica también la coloración amarillenta de los dientes, la halitosis, la gingivitis y la mayor frecuencia caries dental (14).

2. Dependencia y hábito tabáquico

Fumar se considera una drogodependencia, ya que cumple con todos los criterios que definen el consumo de una sustancia como tal: existencia de una necesidad o compulsión hacia la toma periódica o continuada de esa sustancia, tolerancia, y Síndrome de Abstinencia Nicotínica (SAN) en ausencia de la misma (16). Se

considera que el tabaquismo es una enfermedad crónica sistémica que pertenece al grupo de las adicciones, clasificada dentro del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (17).

La nicotina es su principal ingrediente psicoactivo y debe sus propiedades adictivas al aumento de la liberación de dopamina en los circuitos de recompensa y a su acción agonista sobre receptores colinérgicos nicotínicos (figura 2). La estimulación indirecta sobre otros sistemas de neurotransmisión, como el noradrenérgico y el cannabinoide, ha sido implicada en sus propiedades reforzadoras (18).

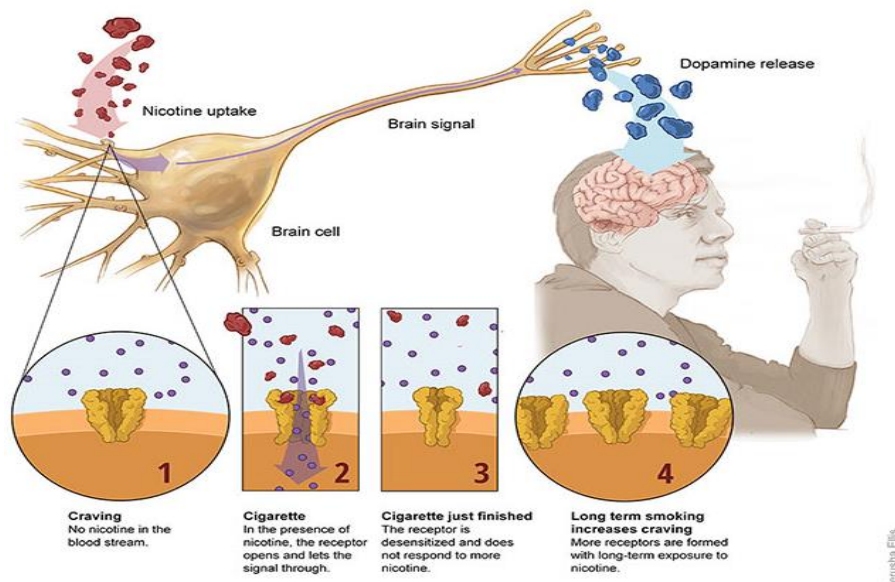


Figura 2: Mecanismo cerebral de la adicción a la nicotina. Influencia de la dopamina. Esta imagen está diseñada para informar de las consecuencias del tabaquismo y educar a los pacientes de un programa de deshabituación tabáquica (16).

El hábito de fumar presenta dos características que al darse conjuntamente lo convierten en un grave problema de salud individual y pública: es adictivo y es tóxico. Es una dependencia relativamente fácil de adquirir y bastante difícil de controlar, lo que permite que se manifieste su toxicidad (19).

La nicotina actúa a través de los receptores colinérgicos de nicotina (nAChR), produciendo liberación de neurotransmisores como dopamina (DA), ácido γ -

aminobutírico (GABA), serotonina (5-HT), norepinefrina, péptidos opiáceos, vasopresina y endorfinas. También otras sustancias presentes en el humo del tabaco actúan aumentando la dopamina al disminuir la enzima monoaminoxidasa (MAO) que la degrada (20,21). La dopamina es liberada en las vías dopaminérgicas del área ventral tegmental (ATV) y de allí asciende al *núcleo accumbens* (NAc) en las áreas prefrontales de la corteza del cerebro (figura 3). El cerebro del fumador muestra el sello característico neurobiológico de las drogas adictivas: un exceso de dopamina en el NAc (20).

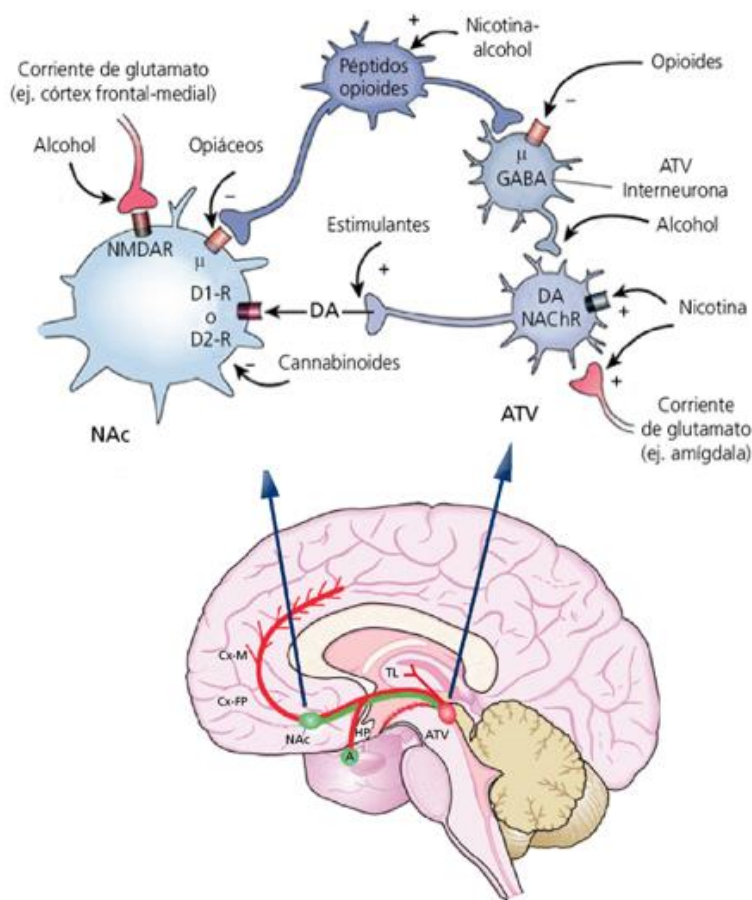


Figura 3: Circuito de recompensa en el cerebro y acciones de las diferentes drogas de abuso. En esta visión del cerebro se señala la vía dopaminérgica, que se extiende desde el ATV con proyecciones al NAc y otras áreas del sistema límbico: amígdala (A), corteza prefrontal (Cx-FP), corteza medial (Cx-M), tálamo (TL), hipocampo (HP) (22).

La abstinencia sigue la vía noradrenérgica, mediada por la norepinefrina que se concentra en las neuronas del *locus ceruleus*. Cuando un fumador trata de no fumar,

los niveles de nicotina caen y la frecuencia de los disparos de las neuronas noradrenérgicas en el *locus ceruleus* llega a ser anormalmente alta, produciendo el SAN (20). Cuando un fumador después de un corto período de abstinencia da una calada a un cigarrillo, inhala una cantidad de nicotina que ocupa el 50% de los receptores nicotínicos presentes en sus neuronas. La presencia de nicotina conduce al incremento de estos receptores, multiplicándose los receptores para ofrecer la diana a la nicotina libre, fenómeno conocido con el nombre de *upregulation* (14).

3. Opciones terapéuticas. Tratamientos

Dejar de fumar produce importantes beneficios para la salud. Pasadas 12 semanas sin fumar se observan mejoras en el transporte de oxígeno, el olfato, el gusto, la respiración, la energía y la respuesta inmune. En 12 meses, el riesgo de enfermedad coronaria volverá a ser la mitad que el de un fumador actual y se reducirá al de un no fumador en 15 años (23).

Actualmente existe una amplia gama de recursos terapéuticos para el tratamiento de la adicción al tabaco. Las intervenciones pueden dividirse en conductuales y farmacológicas (23). El tratamiento del tabaquismo implica además medidas educativas, legislativas y laborales para reducir la morbimortalidad derivada del tabaco a corto y largo plazo de una forma eficaz (18).

La elección de cualquier farmacoterapia para dejar de fumar debe guiarse por las preferencias, contraindicaciones y precauciones del paciente. Se deben tener en cuenta factores específicos, como la posibilidad de eventos adversos, posibles interacciones medicamentosas, la experiencia del individuo con la farmacoterapia y la conveniencia, disponibilidad y costo antes de prescribir cualquier intervención farmacológica (24).

Por otra parte hay que analizar el tipo de dependencia a la nicotina y la intensidad de la misma. Existen diferentes herramientas para ello, como el Test de Richmond o el Test de Fagerström (TF). En nuestro estudio hemos utilizado para analizar la

dependencia física de los fumadores el TF, ya que es el test recomendado en las consultas de tabaquismo (25).

Aunque un alto porcentaje de fumadores intenta dejar de fumar, se ha comprobado que sin ayuda profesional sólo un 3-5% de ellos lo consigue (25).

3.1 Tratamiento cognitivo-conductual. Intervención mínima (IM)

El cigarrillo actúa sobre el cerebro de manera directa (activación de la neurotransmisión cerebral) e indirecta (gestual, costumbres). El aspecto cognitivo corresponde a la información que el cerebro de la persona percibe, como considerar el cigarrillo como algo positivo o negativo. El aspecto conductual abarca las acciones derivadas del hábito tabáquico en el día a día, como el hecho de encender un cigarrillo ante una situación de estrés. La terapia cognitivo-conductual ayuda a aprender estrategias para combatir la dependencia tabáquica y lograr una abstinencia a largo plazo (26).

3.2 Terapia sustitutiva con nicotina (TSN)

La TSN incluye diferentes modalidades de tratamiento, que pueden clasificarse tanto en función de su vía de administración como de su forma de liberación. La TSN fue el primer tratamiento aprobado para la deshabitación tabáquica y es del que mayor experiencia se dispone. Consiste en administrar nicotina a quien desea dejar de fumar por una vía distinta a la del consumo de cigarrillos, y en una cantidad suficiente para mantener ocupados un determinado número de receptores nicotínicos. Dado el pequeño número de efectos adversos que origina, se considera un tratamiento de primera línea muy seguro y de alta eficacia terapéutica demostrada con una evidencia de grado A (27).

Parches de nicotina

Constituyen un dispositivo de administración transdérmica que libera nicotina progresivamente de forma lenta y continuada, logrando así obtener unos niveles

mantenidos en sangre. Están disponibles como presentaciones de 24 y 16 horas, según el tiempo de aplicación y cantidad de nicotina que suministran. Son la elección óptima en Atención Primaria dada su facilidad de uso y la buena adherencia lograda, junto con la escasez de efectos adversos y contraindicaciones (27).

Chicles, comprimidos y spray bucal

Proporcionan una liberación puntual de nicotina por vía oral. Los chicles comercializados contienen 2 y 4 mg de nicotina, siendo equivalentes en sus dosis liberadas a los comprimidos de 1 y 2 mg existentes. Hay que explicar adecuadamente las correctas técnicas de masticación/salivación, y advertir de no infra dosificar el número de piezas necesarias ni reducir el tiempo total de duración del tratamiento programado.

El spray bucal libera 1 mg de nicotina por pulverización y gracias a la absorción más rápida permite alcanzar picos en plasma rápidamente, a una dosis eficaz pero segura. Su tratamiento se compone de 3 fases, y controla óptimamente tanto el SAN como el *craving* (27) (ansia, estado motivacional de apetencia asociado a los efectos reforzantes del consumo de drogas) (28).

Otras formas de TSN existentes, como el spray nasal o el inhalador bucal, no se encuentran comercializadas en España.

Las distintas formulaciones de remplazo de nicotina pueden ser usadas en forma aislada o asociadas con otros medicamentos.

3.3 Bupropion

El bupropion es un inhibidor selectivo de la recaptación neuronal de catecolaminas (noradrenalina y dopamina) con un mínimo efecto sobre la recaptación de indolaminas (serotonina) y que no inhibe la acción de ninguna monoaminoxidasa (29). No se conoce con exactitud cuál es el mecanismo de acción de este fármaco,

aunque se sabe que actúa a nivel del NAc inhibiendo la recaptación neuronal de dopamina; este efecto explicaría la reducción del *craving* que los fumadores experimentan cuando lo utilizan. También inhibe la recaptación neuronal de noradrenalina en el *locus ceruleus* consiguiendo con ello una reducción significativa de la intensidad de los síntomas del SAN. Recientes estudios in vitro han detectado que el bupropion es un inhibidor funcional no competitivo de los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Esta actividad puede contribuir a su eficacia en el tratamiento de la dependencia nicotínica (30).

El mecanismo de acción del bupropion es independiente de su efecto antidepresivo y tiene una eficacia similar a la TSN. En una revisión Cochrane (que incluía 31 ensayos clínicos) bupropion duplicó las tasas de abandono del tabaco en comparación con la ausencia de tratamiento farmacológico (31). No se ha mostrado un beneficio significativo a largo plazo del tratamiento prolongado con bupropion para prevenir recaídas después del abandono inicial. El bupropion puede ser útil en aquellos que fracasan con la TSN. Es igual de efectivo en los fumadores con y sin antecedentes de depresión y no se ha demostrado que bupropion aumente el riesgo de suicidio (32).

3.4 Vareniclina

La vareniclina se une con una alta afinidad y selectividad a los receptores neuronales $\alpha 4\beta 2$. Esta unión produce un efecto suficiente para aliviar los síntomas de abstinencia (actividad agonista parcial), a la vez que produce simultáneamente una reducción de los efectos gratificantes y de refuerzo del fumar al prevenir la unión de nicotina a los mismos receptores $\alpha 4\beta 2$ (actividad antagonista) (33). En casos de recaídas, disminuye las sensaciones placenteras relacionadas con la estimulación del SNC por la nicotina (23).

La vareniclina a dosis estándar aumenta entre dos y tres veces las tasas de abandono del tabaco en comparación con los intentos de abandono sin ayuda farmacológica. Los regímenes a dosis inferiores también tuvieron efectos beneficiosos en el abandono del hábito de fumar y redujeron la incidencia de eventos adversos. Pruebas limitadas indican que la vareniclina puede cumplir una función en la prevención de las recaídas. El efecto adverso más frecuente fueron las náuseas (34).

3.5 Otros tratamientos

Vacuna antinicotina

Las vacunas de nicotina inducen la producción de anticuerpos que se unen específicamente a la nicotina en la sangre, bloqueando su paso por la barrera hematoencefálica y su entrada en el cerebro. Se han presentado como una estrategia atractiva para tratar la adicción a la nicotina (35) (figura 4).

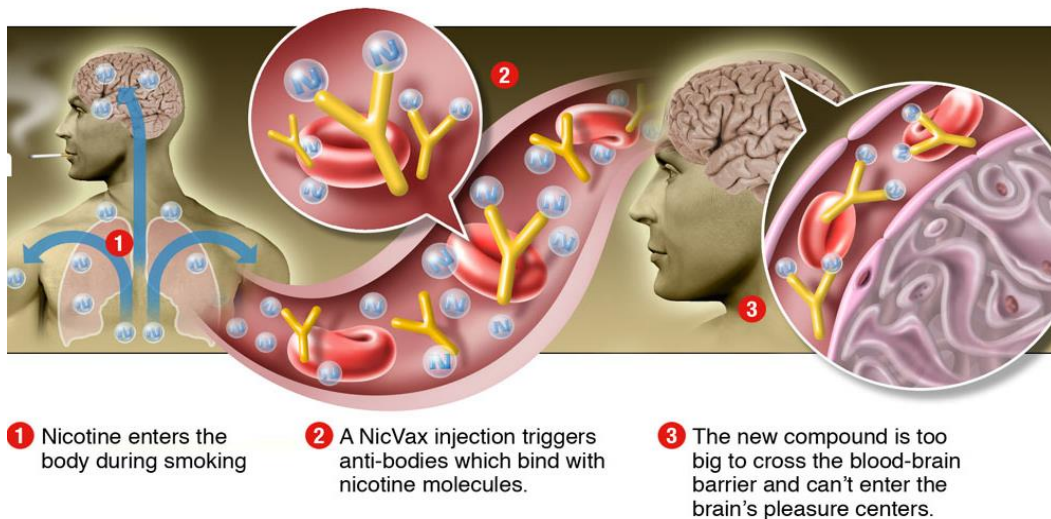


Figura 4: Mecanismo de acción de las vacunas antinicotina. La vacuna estimula la producción de anticuerpos específicos antinicotina. De esta forma, la nicotina no llega al cerebro y no genera placer (38).

En ensayos preclínicos con vacunas de nicotina realizados en las últimas décadas, se ha demostrado eficacia y una alta inmunogenicidad. Estudios en animales han mostrado una reducción del 65% de la nicotina que alcanza los receptores nicotínicos cerebrales y una disminución significativa de la cantidad de dopamina producida por la estimulación por nicotina. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos en humanos no alcanzan la eficacia esperada (35).

Citisina

La citisina deriva de la planta *Cytisus laburnum* y actúa como un agonista parcial de la nicotina de baja eficacia que se une a los subtipos de receptores de nicotina neuronales, particularmente las subunidades $\alpha 4\beta 2$. Estudios recientes han resaltado el potencial de este medicamento para ser usado en países de ingresos limitados donde el tratamiento para dejar de fumar no está incluido en los servicios sanitarios. Los ensayos de eficacia muestran tasas de abandono similares a los estudios que utilizan la TSN, y el doble de abandonos que frente a placebo (24).

Naltrexona

La naltrexona, antagonista opioide, ha sido empleada en la clínica como tratamiento coadyuvante de los programas de deshabituación tabáquica. In vitro se ha observado que altera tanto la expresión como la función de algunas subunidades del receptor nicotínico entre las que destacan la subunidad $\alpha 4$ y la subunidad $\beta 2$. Sin embargo, su eficacia terapéutica todavía no ha sido probada y no se conoce su papel en la dependencia (14).

4. Tabaquismo y genética

Se ha estimado que los factores genéticos contribuyen aproximadamente en un 40-50% en el inicio del consumo del tabaco, en un 70-80% en el grado de dependencia del fumador y en un 50 % en el éxito del tratamiento de deshabituación tabáquica (36).

4.1 Genes relacionados con el metabolismo de la nicotina

La nicotina se metaboliza en un 70-80% en el hígado, principalmente por C-oxidación y, en menor medida, por N-oxidación, N-demetilación y N-glucuronidación. El metabolito principal, la cotinina, es también metabolizado por hidroxilación, N-oxidación y N-glucuronidación. Estos procesos son catalizados por

enzimas de la familia de los citocromos P450 (CYP) (37). Las concentraciones plasmáticas de nicotina vienen determinadas por la acción de proteínas como CYP2A6, CYP2D6, CYP2A13 Y CYP2B6. Variaciones en el metabolismo de la nicotina como consecuencia de la variabilidad de los genes que codifican estas proteínas se han relacionado con un mayor riesgo de consumo de tabaco (36).

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

Las últimas décadas han supuesto una revolución en el conocimiento acerca de las enfermedades cerebrales y, en particular, de la adicción a las drogas. Esto se ha debido, en gran medida, a la identificación de los receptores de neurotransmisores y al desarrollo de modelos animales que, en conjunto, han permitido la investigación de las funciones cerebrales desde el nivel molecular hasta el cognitivo (38). Aunque cada droga posee un mecanismo de acción particular, todas las sustancias de abuso afectan directa o indirectamente a una vía nerviosa presente en el cerebro, que es el sistema de recompensa mesolímbico (39).

La adicción a la nicotina es un trastorno cerebral que se localiza en el sistema mesocórtico-límbico-dopaminérgico. Se cree que los efectos psicoactivos de la nicotina ocurren a través de la activación de los nAChR. En el ATV, la nicotina se une a los nAChR localizados en los terminales nerviosos de las neuronas GABAérgicas y de glutamato que se proyectan en las neuronas dopaminérgicas; pero también la nicotina se une a los nAChR localizados directamente en las neuronas de dopamina. Las neuronas de dopamina se proyectan a varias regiones del cerebro implicadas en la recompensa. La administración de nicotina en última instancia estimula la liberación de dopamina en los terminales del cuerpo estriado dorsal y ventral, en particular en el NAc (figura 5).

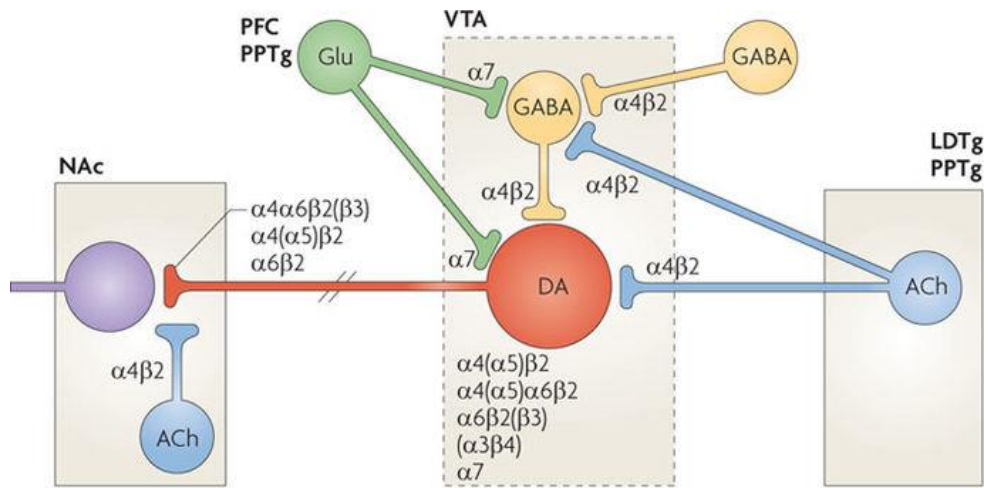


Figura 5: Representación de la neurotransmisión nicotínica (38).

Sistema catecolaminérgico

Uno de los grupos de genes más estudiados en relación con la adicción al tabaco son los que regulan los flujos de dopamina en el SNC. Se sabe que la nicotina, al igual que otras drogas como la cocaína o morfina, aumenta la producción y liberación de dopamina, especialmente en el NAc. También, se ha demostrado un incremento de los valores de dopamina en el núcleo caudado y en el putamen de los fumadores en comparación con los no fumadores (20) (figura 6).

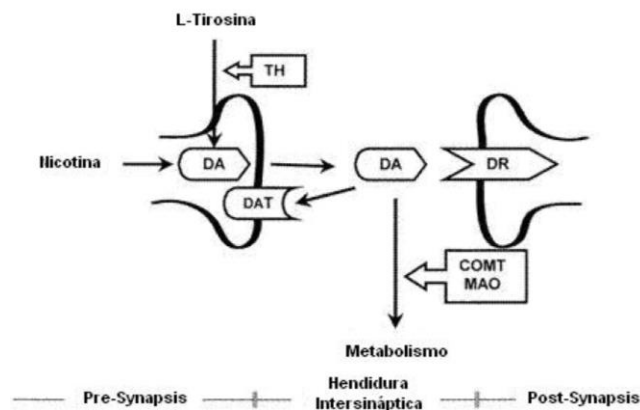


Figura 6: Efectos de la nicotina en la neurotransmisión dopaminérgica. La nicotina aumenta la liberación de dopamina (DA). La proteína Tirosin Hidroxilasa (TH) media la conversión de tirosina a L-dopa, paso limitante de la síntesis de DA. El transportador de dopamina (DAT) regula la cantidad de DA en la sinapsis. COMT y MAO están involucradas en su metabolismo (40).

Se conocen 5 receptores diferentes de dopamina (DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5). Se han descrito asociaciones estadísticamente significativas entre el consumo de tabaco y determinados polimorfismos de los genes que codifican a los receptores DRD1 y DRD2 (34). La dopamina liberada en la sinapsis es recaptada por la proteína DAT46, codificada por el gen SLC6A3, que presenta polimorfismos relacionados con una mayor o menor disponibilidad de dopamina en las sinapsis. Varios son los estudios que han asociado polimorfismos en el gen SLC6A3 con la predisposición a fumar y la abstinencia (36). La proteína MAO-B puede desempeñar un papel importante en el tabaquismo. Los inhibidores de esta enzima evitarían su acción y aumentarían por tanto los niveles de dopamina, por lo que podrían ser eficaces como coadyuvantes en el tratamiento de deshabituación tabáquica (41). También se han descrito asociaciones entre el gen que codifica a la dopamina betahidroxilasa (DBH) con el SAN (42).

Sistema colinérgico

La nicotina ejerce sus funciones fisiológicas y farmacológicas en el cerebro a través de los nAChR. Los nAChR pueden regular la actividad de diferentes vías neuronales en todo el SNC y se consideran importantes moduladores de la cognición y la emoción. Son el principal sitio de acción de la nicotina en el cerebro. No obstante, debido a la escasez de ligandos selectivos para cada subtipo de nAChR, no se conoce la combinación exacta de los nAChR que regula los efectos gratificantes que proporciona fumar y que desencadena la dependencia (43). Los nAChR son canales iónicos dependientes de ligandos que abarcan la membrana y que pueden modular la liberación de neurotransmisores como dopamina, glutamato y GABA. Las 12 subunidades que componen los receptores nicotínicos se dividen en dos familias; la familia de nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) y la familia de tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (figura 7) (44). La estructura compleja de los nAChRs y sus múltiples combinaciones dan lugar a una amplia gama de subtipos de nAChRs. Esta diversidad estructural conlleva una diversidad funcional que ofrece abundantes perspectivas para el diseño de nuevas terapias. Actualmente son objetivo de estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, ansiedad y depresión, el

trastorno de déficit de atención e hiperactividad, epilepsia, dolor y la adicción a nicotina entre otras (45).

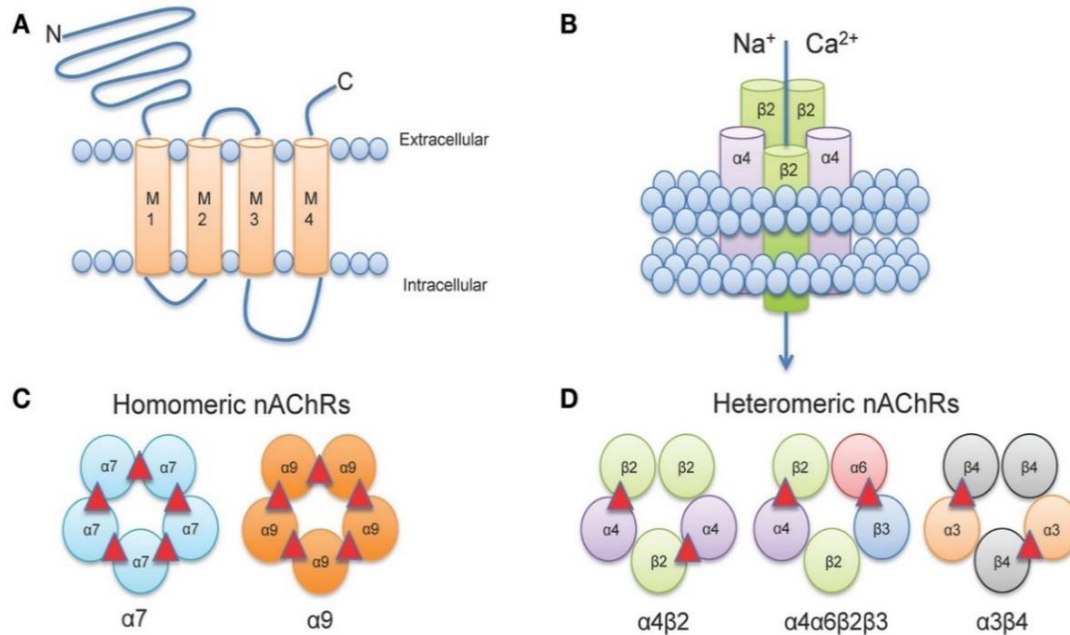


Figura 7: Estructura de los receptores neuronales de acetilcolina.

(A) topología de membrana de una subunidad neuronal nAChR. Cada subunidad nAChR contiene cuatro dominios transmembrana (M1-M4), un extremo amino y carboxilo terminal extracelular, y un bucle intracelular M3-M4 prominente de longitud variable. (B) Cinco subunidades se ensamblan para formar una subunidad funcional. (C) Los receptores homoméricos consisten solo en subunidades α y generalmente tienen baja afinidad por el agonista. Hasta la fecha, solo las subunidades de mamíferos $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (no mostradas) pueden formar homómeros funcionales. (D) La mayoría de los nAChR de alta afinidad son heteroméricos y consisten en una combinación de subunidades α y β . Es importante destacar que múltiples subunidades α pueden ensamblarse con múltiples subunidades β en el complejo pentamérico nAChR (ilustrado aquí por $\alpha 4\alpha 6\beta 3\beta 2$). Los sitios de unión ACh se representan como triángulos rojos. (46)

Los genes CHRNA5, CHRNA3 y CHRNB4 codifican a las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 3$ y $\beta 4$ del receptor nAChR. Estos genes se localizan en el cromosoma 15q25.1. En los tres genes se han descrito múltiples polimorfismos que han sido asociados con la dependencia nicotínica (47,48).

Sistema opioide

El sistema opioide endógeno desempeña un papel importante en las adicciones, ya que sus receptores son activados por diversas drogas de abuso. Por este motivo constituyen un objetivo potencial para posibles tratamientos (49).

Los péptidos opioides derivados de la proencefalina, como los receptores opioides δ , modulan los efectos reforzantes de la nicotina, mientras que los péptidos opioides derivados de la prodinorfina intervienen en los aspectos aversivos y/o disfóricos de la misma. Además, es necesaria la participación de las encefalinas endógenas y de los receptores opioide μ para que la nicotina induzca sus efectos antinociceptivos agudos y los fenómenos de dependencia física. Los receptores opioides μ y κ modulan de manera opuesta la tolerancia a los efectos antinociceptivos inducidos por la nicotina (49). Se han descrito que variantes en el gen que codifica al receptor μ opioide (OPRM1) modifican la dependencia de drogas de abuso como la nicotina, la cocaína y el alcohol a través de la modulación del sistema dopaminérgico (50). Recientemente, también se ha demostrado que ratones que carecían del receptor μ -opioide no obtenían efectos de recompensa por la administración de nicotina, y el SAN era menor, lo que sugiere una interacción entre la nicotina, el sistema opioide y la actividad mesolímbica dopaminérgica (51).

Sistema noradrenérgico

La estimulación de los receptores nicotínicos produce un incremento de la liberación de noradrenalina en el *locus ceruleus*. La estimulación de los receptores α -adrenérgicos contribuye a que no aparezcan síntomas del SAN como la ansiedad, la irritabilidad y el nerviosismo. La utilización de inhibidores de la recaptación neuronal de noradrenalina como reboxetina y de bloqueantes de los receptores β -noradrenérgicos podría ayudar a aliviar estos síntomas, consiguiendo un mejor control de las recaídas (20). En relación con el receptor alfa2A-adrenérgico (ADRA2A), un estudio ha demostrado la asociación entre el polimorfismo C1291G del gen que codifica a dicho receptor con la dependencia al tabaquismo y al alcohol. (52).

Sistema serotoninérgico

La nicotina aumenta la secreción de serotonina y su ausencia la reduce, lo que se ha relacionado con los cambios de humor que acompañan el abandono del tabaco. Se ha descrito que variaciones genéticas en las vías de recaptación de serotonina podrían influir en el hábito tabáquico (36).

La proteína transportadora de la serotonina (5-HTT) ha atraído la atención porque regula la magnitud y duración de la transmisión serotoninérgica. Se ha descrito un polimorfismo en el gen SLC6A4, que codifica la proteína de transporte de la serotonina SLC6A4, que se asocia con un carácter más ansioso vinculado a una mayor ingesta de nicotina y a una mayor dependencia (53).

Sistema cannabinoide

El consumo de cannabis frecuentemente se asocia al consumo de tabaco, además de estar implicados ambos en las zonas y mecanismos de recompensa del cerebro. El sistema cannabinoide regula la liberación de glutamato y GABA e interactúa con neuropéptidos relevantes en la motivación (péptidos opioides y factor de liberación corticotropo) (54).

El sistema cannabinoide incluye los receptores cannabinoideos CB1 y CB2, los cannabinoideos endógenos y los procesos responsables de su biosíntesis, captación celular y metabolismo (55). La variación genómica CB1/CNR1 parece desempeñar un papel en la vulnerabilidad a la adicción humana. El receptor CB1/CNR1 es el principal sitio cerebral en el que la nicotina y cannabis son psicoactivos. Está densamente expresado en circuitos cerebrales que, probablemente, son importantes para los procesos de recompensa y la adicción. Polimorfismos comunes revelan patrones de desequilibrio de ligamiento en individuos europeos y afroamericanos. Un haplotipo 5'CB1/CNR1 'TAG' muestra diferencias estadísticamente significativas entre los que abusan de sustancias y los que no en poblaciones europeas, americanas, afroamericanas y japonesas (56).

Sistema gabaérgico

El GABA y el glutamato están implicados en el mecanismo de recompensa debido a los efectos depresores que la nicotina causa sobre receptores gabaérgicos y opioides del organismo (57). Los agonistas gabaérgicos podrían ser útiles en el tratamiento del tabaquismo ya que al activar el receptor GABA-B disminuye la autoadministración de nicotina, posiblemente debido a la reducción del efecto de recompensa originado por la nicotina. Además, se ha observado que la administración crónica de nicotina incrementa la cantidad de receptores gabaérgicos en modelos animales (20).

Se ha publicado que variantes en el gen GABA-BR2, que codifica la subunidad 2 del receptor GABA-B, podrían jugar un papel importante en la dependencia nicotínica (58). Por otra parte, existe una relación significativa entre las variantes de los genes GABA-BR1 y GABA-BR2 en la dependencia nicotínica: GABA-BR1 de forma individual se asocia débilmente con la adicción pero los polimorfismos en el gen GABA-BR2 podrían alterar directamente la susceptibilidad (59).

Óxido nítrico

La nicotina ejerce parte de sus acciones en el cerebro mediante el óxido nítrico (NO), principalmente al aumentar su producción. De esta manera, además de los tratamientos existentes, la inhibición farmacológica de la óxido nítrico-sintetasa o la administración de compuestos que liberan NO podrían servir como posibles estrategias terapéuticas contra el tabaquismo (60). Se sospecha que la base de esta relación radica en la modificación del paso de los iones a través del receptor colinérgico nicotínico, lo que influiría en la regulación de la síntesis de NO al permitir la entrada masiva de calcio (44). Recientemente se ha publicado la asociación entre polimorfismos en el gen que codifica a la NO sintetasa endotelial (eNOS) con la adicción al tabaco (61).

5. Farmacogenética. Individualización del tratamiento

El mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el tabaquismo debería conducir al desarrollo de terapias farmacológicas más personalizadas, lo que constituye hoy día un objetivo prioritario de la investigación (45). Un mismo tratamiento produce una gran variabilidad interindividual en la respuesta farmacológica.

Los avances en la síntesis de nuevos fármacos se centran en conseguir tratamientos más seguros y eficaces. En el tratamiento de muchas enfermedades complejas, la eficacia del tratamiento farmacológico se sitúa en torno al 30-60%. Si esta eficacia dependiese de factores genéticos y estos se pudieran conocer antes de iniciar el tratamiento, se podría seleccionar la mejor alternativa terapéutica con mayores probabilidades de éxito de modo que podrán evitar tratamientos inefectivos y la aparición efectos adversos innecesarios (46).

Así surgen la farmacogenética, dedicada al estudio de la influencia de la variabilidad genética en la respuesta (eficacia y tolerancia) a los medicamentos, y la genómica funcional, que pretende la comprensión de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades para identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevos fármacos. Todo ello con el fin de incrementar la eficacia terapéutica y reducir las consecuencias desfavorables derivadas del uso de medicamentos, es decir, evitar la ineficacia terapéutica o la toxicidad farmacológica (62).

De este modo, uno de los grandes impactos del Proyecto del Genoma Humano que empieza a ser evidente es la utilización de la información genética para el diseño de nuevos fármacos, basándose en la identificación de sus moléculas diana y de los mecanismos que regulan la expresión de los genes. Estos estudios han originado una nueva disciplina, la farmacogenómica, que estudia la respuesta conjunta de múltiples genes frente a un fármaco, a diferencia de la farmacogenética tradicional, que estudia la acción de un solo gen. De este modo, en un futuro próximo podrán diseñarse fármacos más específicos y, por tanto, más eficaces (62).



HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Fumar es la principal causa evitable de morbimortalidad prematura. Se ha estimado que el 50% de los fumadores morirá a causa de una enfermedad relacionada con el consumo de tabaco, y la mitad de ellos lo hará entre los 35-69 años. Es un problema de salud mundial al que se le atribuyen aproximadamente 7 millones de muertes anuales, de las cuales 6 millones son debidas al consumo directo y más de 600 000 son no-fumadores expuestos al humo ajeno. En España, se estima que 1 de cada 4 muertes en varones y 1 de cada 50 muertes en mujeres se deben al tabaco, lo que suponen unas 52000 muertes al año. La carga mundial de salud y económica del consumo de tabaco es enorme. El carácter adictivo del tabaco, que radica en los efectos farmacológicos de la nicotina, explica las dificultades que experimentan los fumadores para dejar de fumar.

La adicción a la nicotina es un trastorno cerebral que se localiza en el sistema mesocórtico-límbico-dopaminérgico, y que implica a multitud de neurotransmisores. Se cree que los efectos psicoactivos de la nicotina ocurren a través de su activación de los nAChR. La exposición a la nicotina de forma crónica conduce a la desensibilización y a la regulación del subtipo $\alpha 4\beta 2$ de nAChR. La administración de nicotina estimula, en última instancia, la liberación de dopamina en los terminales del cuerpo estriado dorsal y ventral, en particular en el NAc. Se ha demostrado que fumar cigarrillos aumenta los niveles plasmáticos de opiáceos endógenos y que la nicotina estimula la liberación de β -endorfinas en cultivos de células neuronales.

Las estrategias de prevención prioritarias han de centrarse en los factores que propician el proceso inicio del tabaquismo, pero para los que ya han adquirido el hábito y quieren dejar de fumar, la optimización de la terapia de deshabituación y la elección del mejor tratamiento para cada individuo es un punto clave. Dada la complejidad de caracterización del fenotipo de dependencia a la nicotina, es difícil que un único tratamiento sea eficaz y seguro para todos los fumadores. Desde los primeros estudios farmacogenéticos aprobados por la FDA se han identificado diferentes genes implicados la adicción al tabaco. Por ello, actualmente es crucial estudiar la farmacogenética para predecir la respuesta terapéutica en los pacientes en deshabituación tabáquica y elegir el más idóneo.

Por todo ello, y con el fin de determinar nuevos factores genéticos que intervengan en el proceso de deshabituación tabáquica nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Caracterización epidemiológica y clínica de los pacientes que acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.
- 2- Caracterizar si la variabilidad del gen OPRM1 (implicado en el sistema opioide), de los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 (implicados en el sistema colinérgico) y del gen CNR1 (implicado en el sistema cannabinoide) modifican la capacidad de deshabituación tabáquica de los pacientes.
- 3- Caracterizar si la variabilidad de los genes OPRM1, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4 y CNR1 condicionan la efectividad de los tratamientos utilizados en los procesos de deshabituación tabáquica.



PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes

El estudio realizado ha incluido a 540 pacientes, considerados fumadores según el criterio de la OMS, es decir, sujetos que fuman, independientemente de la frecuencia y la cantidad de cigarrillos (63).

Todos los pacientes incluidos en este estudio acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre Abril del 2001 y Febrero del 2011, para recibir terapia de deshabituación tabáquica siguiendo el protocolo de actuación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (47,48). Todos ellos firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, que fue aprobado por el Comité Ético del hospital.

A todos se les informó debidamente de la naturaleza y objetivos del estudio, y se les solicitó la autorización para la extracción de sangre periférica para los estudios de asociación genética.

2. Recogida de datos

Se realizó un estudio prospectivo con seguimiento de los pacientes y registrando todo el proceso en la historia clínica. Se recogieron datos epidemiológicos y clínicos tanto en la primera consulta como en consultas sucesivas de control.

Se estudiaron como variables la edad, sexo, los cigarrillos/día fumados, la valoración de dependencia nicotínica según el Test de *Fagerström* (TF), el tipo de tratamiento recibido (IM, TSN, bupropion o vareniclina), si lograron la abstinencia o no y los meses que se mantuvieron sin fumar.

El TF lo dividimos en bajo (0-6) (n=226) y alto (7-10) (n=314) en función de los valores de media, mediana y moda de nuestra muestra de pacientes.

La abstinencia se ha estudiado haciendo varios cortes transversales a lo largo del seguimiento de los pacientes en la consulta de tabaquismo. No se detalla el análisis estadístico del corte del primer y tercer mes desde el inicio del tratamiento puesto que no es relevante una abstinencia tan corta desde el punto de vista médico. Por el contrario, se presenta el estudio cuando han transcurrido 6 meses y un año de abstinencia.

A efectos de valoración del resultado del proceso clínico de cesación tabáquica se consideraron las abstinencias declaradas por los propios pacientes. Por otra parte, dichas afirmaciones fueron cotejadas con los valores de cotinina en sangre medidos a los 6 meses y al año de abstinencia.

Se ha considerado éxito del tratamiento en términos de abstinencia, si el paciente se mantenía sin fumar al menos un año desde el inicio del tratamiento de deshabituación.

3. Extracción del DNA de sangre periférica

De cada paciente se procedió a la extracción DNA genómico de alto peso molecular a partir de los leucocitos de sangre periférica.

3.1 Obtención de células mononucleadas de sangre periférica.

Se obtuvieron células mononucleadas de sangre periférica de los pacientes, recogida en tubos con anticoagulante EDTA, mediante gradientes de densidad por centrifugación durante 20 minutos a 400G a 4°C dando lugar a tres fases: fase superior plasmática, la interfase con células nucleadas, y la fase inferior eritrocitaria. A la capa intermedia que contenía las células nucleadas, se le añadió agua bidestilada estéril para provocar la lisis osmótica de los eritrocitos arrastrados en el paso previo. Tras una nueva centrifugación durante 20 minutos a 400g a 4°C se resuspendió el botón celular de células nucleadas en tampón *Fornace* (0,25 M sacarosa, 50 Mm Tris-HCL pH 7,5 25 Mm MgCl, 5 Mm MgCl₂). A esta mezcla se le añadió EDTA

(10 Mm de concentración final), proteinasa K (*Boehring Mannheim FRG*) y SDS (dodecil sulfato sódico al 1% de concentración final) en una concentración estimada de 5×10^6 células/ml, incubándose la mezcla a 55°C durante 8-16 horas.

3.2 *Purificación del DNA.*

La purificación del DNA se realizó con fenol-CIAA (cloroformo / alcohol isoamílico 24:1 v/v) centrifugándolo durante 10 minutos a 580g a temperatura ambiente, recogiendo la fase sobrenadante acuosa que contiene el DNA en solución. Tras añadir un volumen igual de fenol-CIAA a la fase acuosa se la sometió a una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente, tras la precipitación del DNA mediante 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío (-20° C), se lavó con etanol al 70% y, tras centrifugación breve a 1600g, se dejó evaporar el etanol y se disolvió el DNA en agua bidestilada estéril.

3.3 *Cuantificación del DNA*

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA obtenido se calcularon tras medir la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (GeneQuante, Pharmacia). El cociente DO260/DO280 se empleó para determinar el grado de contaminación proteica: 260 nm fue la longitud de onda a la que absorbe el DNA y 280 nm a la que se absorben las proteínas. Se consideraron aceptables valores comprendidos entre 1,6 y 2, siendo el óptimo 1,8. Las muestras de DNA se conservaron a -20° C en tubos *Eppendorf*.

4. Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan.

En la discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan, la amplificación y la detección del genotipo ocurren simultáneamente. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que hibridan específicamente con cada alelo en la región donde se localiza el polimorfismo de estudio. Las sondas están marcadas con un fluorocromo

donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta y ambos se encuentran próximos. Las sondas utilizadas en nuestro trabajo estaban marcadas con los fluorocromos VIC y FAM para cada alelo. La reacción de PCR requiere además: Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y cebadores sentido y anti-sentido (figura 8).

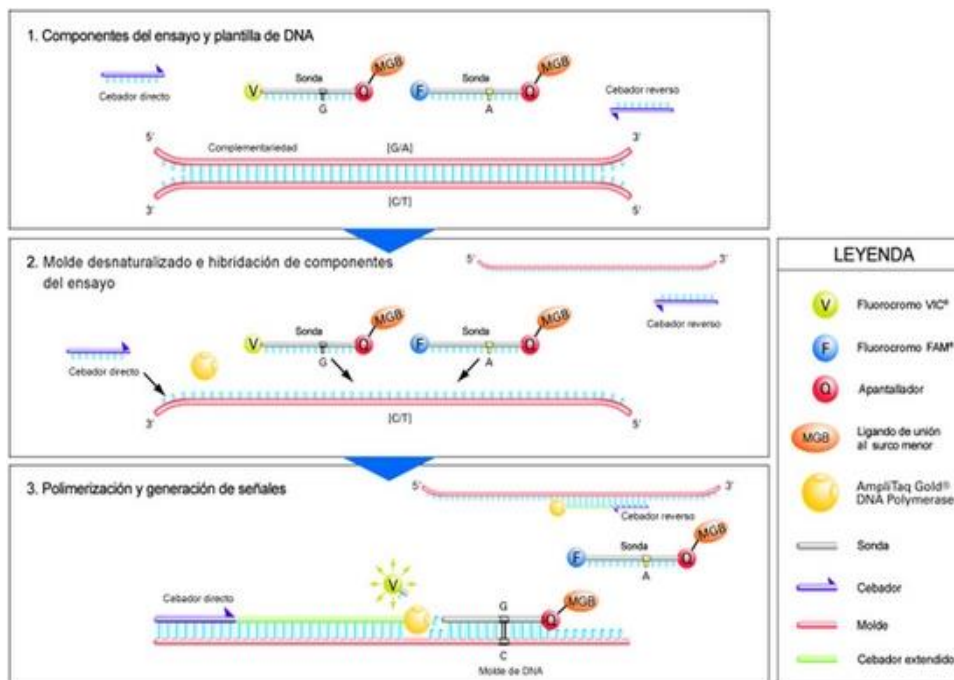


Figura 8: Representación del proceso del ensayo de expresión génica con sondas TaqMan.

Se lleva a cabo en termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia. Durante la amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa, que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Al quedar separados, la fluorescencia emitida por el fluorocromo es captada por el lector. Además, la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, permitiendo en todo momento conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación. Los resultados de cada reacción se representan los pacientes distribuidos en función de su genotipo (figura 9).

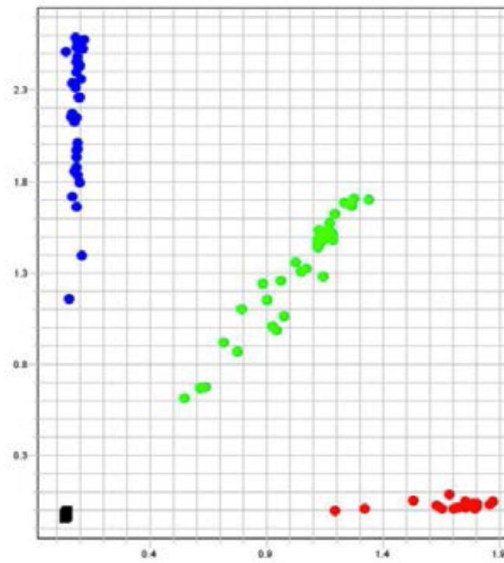


Figura 9: Representación de los resultados de discriminación alélica con sondas TaqMan del polimorfismo rs16969968 del gen CHRNA5. Cada nube de puntos representa uno de los genotipos posibles: los azules son homocigotos GG, los rojos homocigotos AA y los verdes heterocigotos AG.

Mediante esta técnica se analizaron diversos polimorfismos de genes implicados en los sistemas opioide, colinérgico y cannabinoide (tabla 1).

Tabla 1: Polimorfismos estudiados en el presente estudio mediante discriminación alélica con sondas TaqMan

Gen	Sistema	Polimorfismo	Sonda TaqMan (Applied Biosystems)	Cambio	
OPRM1	Opioide	rs1799971	C_8950074_1	A>G	N40D
CNR1	Cannabinoide	rs6454674	C_1148433_10	G>T	Intrón
CHRNA3	Colinérgico	rs1051730	C_9510307_20	C>T	Y215Y
CHRNA5	Colinérgico	rs16969968	C_26000428_20	A>G	N398D
CHRNA4	Colinérgico	rs17487223	C_32510316	C>T	Intrón

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS (versión 21.0). Se consideró la existencia de significación estadística cuando se halló un p-valor menor de 0,05.

Para el análisis descriptivo de los datos, se calculó la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa y las variables cuantitativas se describen en términos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

En los estudios de asociación de polimorfismos y en el caso de variables cualitativas se analizó la distribución mediante el *test* X^2 de Pearson o el *test* de Fisher. En aquellos casos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se realizó una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. En el estudio de las variables cuantitativas se aplicó un ANOVA en el caso de que los datos cumplieren igualdad de varianzas (homozasticidad) y siguiesen una distribución normal. En el caso de que las variables no cumplieren la igualdad de varianzas ni siguiesen una distribución normal, se aplicó el *test* de Mann Whitney (2 muestras independientes) o el *test* de Kruskal-Wallis (K muestras independientes). La homozasticidad y la distribución de las muestras se comprobaron con la aplicación del *test* de Levene y con la aplicación del *test* de Kolmogorov-Smirnov respectivamente.



RESULTADOS

1. Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes.

En el presente estudio hemos incluido a 540 pacientes, de los cuales 294 eran hombres (54,4%) y 246 eran mujeres (45,6%). Todos ellos acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Servicio de Neumología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca con el propósito de dejar de fumar.

La edad media fue $45 \pm 10,86$ años, fumaban una media de $26 \pm 11,92$ cigarros al día, y el valor de TF medio fue $6,73 \pm 1,73$. En 48 pacientes (8,9%) el único tratamiento recibido fue conductual con IM, 230 pacientes (42,6%) recibieron como tratamiento TSN, 147 (27,2%) bupropion, y 112 (20,7%) vareniclina. La combinación de bupropion y TSN fue el tratamiento de 3 pacientes (0,6%).

Consiguieron dejar de fumar durante al menos 6 meses 294 pacientes (54,44%) y 221 (40,92%) consiguieron mantenerse abstinentes al menos un año.

Nuestros resultados muestran que ni la edad ni el sexo de los pacientes son factores determinantes a la hora de dejar de fumar. Al analizar los resultados a los 6 meses de abstinencia, la edad media de los pacientes que lograron dejar de fumar fue de $44,75 \pm 10,56$ años frente a los $44,62 \pm 10,58$ años de los que no lo consiguieron (p-valor=0,890); por sexos, del total de los pacientes que consiguen dejar de fumar durante seis meses el 56,1% fueron hombres y el 56,5% eran mujeres (p-valor=0,929). Por otra parte, si analizamos los resultados tras un año de abstinencia, la edad media de los pacientes que lograron dejar de fumar fue de $44,53 \pm 10,47$ años frente a los $44,87 \pm 11,02$ años de los que no lo consiguieron (p-valor=0,712); por sexos, del total de los pacientes que consiguen dejar de fumar durante al menos un año el 41,5% eran hombres y el 43,1% fueron mujeres (p-valor=0,709) (tabla 2).

Tabla 2: Resultados de abstinencia según edad y sexo de los pacientes incluidos en nuestro estudio

	Abstinencia 6 meses		Abstinencia 1 año	
	No	Si	No	Si
Edad (años±DS)	44,62±10,58	44,75 ±10,56	44,87 ±11,02	44,53 ±10,47
	p-valor=0,890		p-valor=0,712	
Sexo (%)	43,9 % hombres	56,1% hombres	58,5% hombres	41,5% hombres
	43,5 % mujer	56,5% mujeres	56,9% mujeres	43,1% mujeres
	p-valor=0,929		p-valor=0,709	

Según nuestro estudio, el número de cigarrillos fumados al día sí influye significativamente en el TF ($p\text{-valor}<0,001$, $r=0,593$). Por el contrario, no existe relación significativa entre la cantidad de cigarrillos consumidos diariamente y el número de meses de abstinencia alcanzado ($p=0,261$).

En el estudio de la relación entre el valor del TF y la respuesta en términos de abstinencia, nuestros resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que consiguieron dejar de fumar y los que no. Los pacientes que consiguieron dejar de fumar durante al menos un año tenían un TF de $6,53 \pm 1,73$ frente al $6,98 \pm 1,74$ de los pacientes que no lo consiguieron ($p=0,003$). Los resultados obtenidos tomando la abstinencia como seis meses sin fumar fueron muy similares. Los pacientes que consiguieron dejar de fumar durante al menos seis meses tenían un TF de $6,58 \pm 1,69$ frente al $6,93 \pm 1,80$ de los pacientes que no lo consiguieron ($p=0,020$).

En el análisis del tiempo de abstinencia en función del valor del TF, nuestros resultados mostraron que un mayor valor de TF se asocia de forma estadísticamente significativa con un menor número de meses de abstinencia ($p\text{-valor}<0,021$, $r=-0,099$).

En los siguientes estudios de eficiencia de los tratamientos, y en los posteriores de farmacogenética, no se han tenido en cuenta a los 3 pacientes tratados con la

combinación de bupropion y TSN por ser un número poco relevante desde el punto de vista estadístico.

En la tabla 3 se muestra el número de meses de abstinencia (valor medio) que se alcanza con cada uno de los tratamientos empleados. Únicamente existen diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la IM frente al resto de tratamientos (IM vs TSN, p-valor= 0,002; IM vs bupropion, p-valor = 0,048 y IM vs vareniclina, p-valor= 0,002). El resto de comparaciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Es decir el tratamiento que fue más efectivo fue la IM.

Tabla 3: Abstinencias conseguidas (valor medio, en meses) con cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Meses de abstinencia
IM	13,67 ± 23,01
TSN	7,54 ± 10,10
Bupropion	8,76 ± 7,08
Vareniclina	6,83 ± 4,92

En el estudio de la edad y el sexo de los pacientes que consiguieron dejar de fumar en función del tratamiento empleado, nuestros resultados mostraron el sexo no es un factor determinante en el éxito de un determinado tratamiento. Nuestros resultados también mostraron que en el caso del tratamiento con IM, TSN y bupropion la edad no está relacionada con el éxito del tratamiento, por el contrario si que se observa como el tratamiento con vareniclina es más eficaz en los pacientes de mayor edad (tabla 4). Sólo se muestran los resultados correspondientes a los pacientes que consiguen la abstinencia durante un año pues son muy similares a los obtenidos si tenemos en cuenta la abstinencia durante seis meses.

Tabla 4: Edad y sexo de los pacientes en función del tratamiento empleado y el éxito del mismo. (Abs: abstinencia, IM: intervención mínima, TSN: terapia sustitutiva de nicotina, Bpr: bupropion, Vrn: vareniclina)

	Abs	IM	p-valor	TSN	p-valor	Bpr	p-valor	Vrn	p-valor
Edad	No	42,2±11,7	0,461	44,9±10,9	0,138	44,1±8,7	0,999	45,1±10,6	0,024
	Si	44,7±11,6		42,8±9,5		44,2±10,1		50,3±13,3	
Sexo, varón	No	18 (69,2%)	0,175	74 (61,7%)	0,651	39 (49,4%)	0,647	40 (59,7%)	0,839
	Si	8 (30,8%)		46 (38,3%)		40 (50,6)		27 (40,3%)	
Sexo, mujer	No	11 (50%)	0,175	71 (64,5%)	0,651	31 (45,6%)	0,647	26 (57,8%)	0,839
	Si	11 (50%)		39 (35,5%)		37 (54,4%)		19 (42,2%)	

2. Influencia de la variabilidad de los genes OPRM1, CNR1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 en el proceso de deshabituación tabáquica.

Los resultados del apartado anterior nos mostraron que los valores de TF son importantes en la capacidad de dejar de fumar de los pacientes; por ello, en primer lugar, se analizó si los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 se asocian con los valores de TF. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de los diferentes genotipos de los polimorfismos y el TF de los pacientes (tabla 5).

Tabla 5: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en función del TF, categorizado en bajo (1-6) y alto (7-10). Los p-valores fueron ajustados por edad y sexo.

SNP	Genotipo	TF bajo	TF alto	p-valor
OPRM1 rs1799971	AA	142 (62,8%)	205 (65,3%)	0,730
	AG	76 (33,6%)	96 (30,6%)	
	GG	8 (3,5%)	13 (4,1%)	
	AA	142 (62,8%)	205 (65,3%)	0,557
	AG+GG	84 (37,2%)	109 (34,7%)	
	AA+AG	218 (96,5%)	301 (85,9%)	0,722
GG	8 (3,5%)	13 (4,1%)		
CNR1 rs6454674	GG	21 (9,3%)	20 (6,4%)	0,395
	GT	88 (38,9%)	133 (42,4%)	
	TT	117 (51,8%)	161 (51,3%)	
	GG	21 (9,3%)	20 (6,4%)	0,206
	GT+TT	205 (90,7%)	294 (93,6%)	
	GG+GT	109 (48,2%)	153 (48,7%)	0,909
TT	117 (51,8%)	161 (51,3%)		
CHRNA3 rs1051730	CC	50 (22,1%)	63 (20,1%)	0,733
	CT	107 (47,3%)	159 (50,6%)	
	TT	69 (30,5%)	92 (29,3%)	
	CC	50 (22,1%)	63 (20,1%)	0,562
	CT+TT	176 (77,9%)	251 (79,9%)	
	CC+CT	157 (69,5%)	222 (70,7%)	0,758
TT	69 (30,5%)	92 (29,3%)		
CHRNA5 rs16969968	AA	50 (22,1%)	63 (20,1%)	0,733
	AG	107 (47,3%)	159 (50,6%)	
	GG	69 (30,5%)	92 (29,3%)	
	AA	50 (22,1%)	63 (20,1%)	0,562
	AG+GG	176 (77,9%)	251 (79,9%)	
	AA+AG	157 (69,5%)	222 (70,7%)	0,758
GG	69 (30,5%)	92 (29,3%)		
CHRNB4 rs17487223	CC	65 (28,8%)	87 (27,7%)	0,715
	CT	109 (48,2%)	162 (51,6%)	
	TT	52 (23,0%)	65 (20,7%)	
	CC	65 (28,8%)	87 (27,7%)	0,788
	CT+TT	161 (71,2%)	227 (72,3%)	
	CC+CT	174 (77,0%)	249 (79,3%)	0,521
TT	52 (23,0%)	65 (20,7%)		

Posteriormente se estudió si la variabilidad de los genes OPRM1, CNR1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 modifica la capacidad de dejar de fumar de los pacientes. Por ello se analizó la distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en función de la abstinencia conseguida. El estudio se ha llevado a cabo ajustando el análisis en función del sexo, la edad y el TF.

En primer lugar el análisis se llevó a cabo tomando como abstinencia el dejar de fumar durante 6 meses. Nuestros resultados mostraron que los pacientes portadores del genotipo GG del polimorfismo OPRM1 rs1799971 tienen una mayor capacidad para dejar de fumar (tabla 6).

Tabla 6: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRN4 rs17487223 en función de la abstinencia conseguida a los 6 meses. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	SÍ Abstinencia	p-valor	OR (IC=95%)
OPRM1 rs1799971	AA	167 (67,9%)	180 (61,2%)	0,068	
	AG	74(30,1%)	98 (33,3%)		
	GG	5 (2,0%)	16 (5,4%)		
	AA	167 (67,9%)	180 (61,2%)	0,108	
	AG+GG	79 (32,1%)	114 (38,8%)		
	AA+AG	241 (98,0%)	278 (94,6%)	/	1,00
GG	5 (2,0%)	16 (5,4%)	0,041	2,77 (1,01-7,69)	
CNR1 rs6454674	GG	22 (8,9%)	19 (6,5%)	0,261	
	GT	106 (43,1%)	115 (39,1%)		
	TT	118 (48,0%)	160 (54,4%)		
	GG	22 (8,9%)	19 (6,5%)	0,278	
	GT+TT	224 (91,1%)	275 (93,5%)		
	GG+GT	128 (52,0%)	134 (45,6%)	0,135	
TT	118 (48,0%)	160 (54,4%)			
CHRNA3 rs1051730	CC	57 (23,2%)	56 (19,0%)	0,487	
	CT	119 (48,4%)	147 (50,0%)		
	TT	70 (28,5%)	91 (31,0%)		
	CC	57 (23,2%)	56 (19,0%)	0,241	
	CT+TT	189 (76,8%)	238 (81,0%)		
	CC+CT	176 (71,5%)	203 (69,0%)	0,528	
TT	70 (28,5%)	91 (31,0%)			
CHRNA5 rs16969968	AA	57 (23,2%)	56 (19,0%)	0,487	
	AG	119 (48,4%)	147 (50,0%)		
	GG	70 (28,5%)	91 (31,0%)		
	AA	57 (23,2%)	56 (19,0%)	0,241	
	AG+GG	189 (76,8%)	238 (81,0%)		
	AA+AG	176 (71,5%)	203 (69,0%)	0,528	
GG	70 (28,5%)	91 (31,0%)			
CHRN4 rs17487223	CC	65 (26,4%)	87 (29,6%)	0,259	
	CT	120 (48,8 %)	151 (51,4%)		
	TT	61 (24,8%)	56 (19,0%)		
	CC	65 (26,4%)	87 (29,6%)	0,415	
	CT+TT	181 (73,6%)	207 (70,4%)		
	CC+CT	185 (75,2%)	238 (81,0%)	0,106	
TT	61 (24,8%)	56 (19,0%)			

Por otra parte, se repitió el mismo estudio pero considerando abstinencia a dejar de fumar al menos durante un año. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores; tanto el estudio de dominancia como el de co-dominancia mostraron que ser portador del genotipo GG del polimorfismo OPRM1 rs1799971 se asoció con una mayor capacidad para dejar de fumar (tabla 7).

Tabla 7: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRN4 rs17487223 en función de la abstinencia conseguida tras 1 año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	Sí Abstinencia	p-valor	OR (IC=95%)
OPRM1 rs1799971	AA	211 (67,6%)	136 (59,6%)	/	1,00
	AG	95 (30,4%)	77 (33,8%)	0,225	1,25 (0,87-1,82)
	GG	6 (1,9%)	15 (6,6%)	0,006	3,88 (1,47-10,24)
	AA	211 (67,6%)	136 (59,6%)	0,056	
	AG+GG	101 (32,4%)	92 (40,4%)		
	AA+AG	306 (98,1%)	213 (93,4%)	/	1,00
	GG	6 (1,9%)	15 (6,6%)	0,009	3,59 (1,37-9,41)
CNR1 rs6454674	GG	28 (9,0%)	13 (5,7%)		
	GT	130 (41,7%)	91 (39,9%)	0,272	
	TT	154 (49,4%)	124 (54,4%)		
	GG	28 (9,0%)	13 (5,7%)	0,156	
	GT+TT	284 (91,0%)	215 (94,3%)		
	GG+GT	158 (50,6%)	104 (45,6%)	0,248	
	TT	154 (49,4%)	124 (54,4%)		
CHRNA3 rs1051730	CC	69 (22,1%)	44 (19,3%)		
	CT	148 (47,4%)	118 (51,8%)	0,578	
	TT	95 (30,4%)	66 (28,9%)		
	CC	69 (22,1%)	44 (19,3%)	0,427	
	CT+TT	243 (77,9%)	184 (80,7%)		
	CC+CT	217 (69,6%)	162 (71,1%)	0,706	
	TT	95 (30,4%)	66 (28,9%)		
CHRNA5 rs16969968	AA	69 (22,1%)	44 (19,3%)		
	AG	148 (47,4%)	118 (51,8%)	0,578	
	GG	95 (30,4%)	66 (28,9%)		
	AA	69 (22,1%)	44 (19,3%)	0,427	
	AG+GG	243 (77,9%)	184 (80,7%)		
	AA+AG	217 (69,6%)	162 (71,1%)	0,706	
	GG	95 (30,4%)	66 (28,9%)		
CHRN4 rs17487223	CC	89 (28,5%)	63 (27,6%)		
	CT	151 (48,4%)	120 (52,6%)	0,553	
	TT	72 (23,1%)	45 (19,7%)		
	CC	89 (28,5%)	63 (27,6%)	0,820	
	CT+TT	223 (71,5%)	165 (72,4%)		
	CC+CT	240 (76,9%)	183 (80,3%)	0,352	
	TT	72 (23,1%)	45 (19,7%)		

3. Estudio de Farmacogenética. Influencia de la variabilidad de los genes OPRM1, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4 y CNR en la efectividad del tratamiento utilizado.

En vista de que los resultados de la distribución genotípica en función de la abstinencia son similares a los 6 meses y al año de tratamiento, realizamos los estudios de farmacogenética considerando abstinencia el mantenerse sin fumar durante un año desde el inicio del tratamiento.

3.1. Tratamiento con IM

Se realizó un estudio de la distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 de los fumadores que recibieron como tratamiento de deshabituación tabáquica una IM (tabla 8). Nuestros resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con IM que lograron la abstinencia tras un año de tratamiento y los que y los polimorfismos incluidos en el estudio.

Tabla 8: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con IM en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	SÍ Abstinencia	p-valor
OPRM1 rs1799971	AA	17 (58,6%)	9 (47,4%)	0,389
	AG	12 (41,4%)	9 (47,4%)	
	GG	0 (0,0%)	1 (5,3%)	
OPRM1 rs1799971	AA	17 (58,6%)	9 (47,4%)	0,444
	AG+GG	12 (41,4%)	10 (52,6%)	
OPRM1 rs1799971	AA+AG	29 (100,0%)	18 (94,7%)	0,212
	GG	0 (0,0%)	1 (5,3%)	
CNR1 rs6454674	GG	4 (13,8%)	1(5,3%)	0,566
	GT	13 (44,8%)	8 (42,1%)	
	TT	12 (41,4%)	10 (52,6%)	
CNR1 rs6454674	GG	4 (13,8%)	1 (5,3%)	0,344
	GT+TT	25 (86,2%)	18 (94,7%)	
CNR1 rs6454674	GG+GT	17 (58,6%)	9(47,4%)	0,444
	TT	12 (41,4%)	10 (52,6%)	
CHRNA3 rs1051730	CC	2 (6,9%)	1 (5,3%)	0,910
	CT	15 (51,7%)	11 (57,9%)	
	TT	12 (41,4%)	11 (36,8%)	
CHRNA3 rs1051730	CC	2 (6,9%)	1 (5,3%)	0,819
	CT+TT	27 (93,1%)	18 (94,7%)	
CHRNA3 rs1051730	CC+CT	17 (58,6%)	12 (63,2%)	0,753
	TT	12 (41,4%)	7 (36,8%)	
CHRNA5 rs16969968	AA	2 (6,9%)	1 (5,3%)	0,910
	AG	15 (51,7%)	11 (57,9%)	
	GG	12 (41,4%)	7 (36,8%)	
CHRNA5 rs16969968	AA	2 (6,9%)	1 (5,3%)	0,819
	AG+GG	27 (93,1%)	18 (94,7%)	
CHRNA5 rs16969968	AA+AG	17 (58,6%)	12 (63,2%)	0,753
	GG	12 (41,4%)	7 (36,8%)	
CHRNB4 rs17487223	CC	13 (44,8%)	5 (26,3%)	0,382
	CT	14 (48,3%)	13 (68,4%)	
	TT	2 (6,9%)	1 (5,3%)	
CHRNB4 rs17487223	CC	13 (44,8%)	5 (26,3%)	0,195
	CT+TT	16 (55,2%)	14 (73,7%)	
CHRNB4 rs17487223	CC+CT	27 (93,1%)	18 (94,7%)	0,819
	TT	2 (6,9%)	1 (5,3%)	

3.2. *Tratamiento con TSN*

Se realizó un estudio de la distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 de los fumadores que recibieron como tratamiento de deshabituación tabáquica la TSN (tabla 9). Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los que consiguen la abstinencia y los que no al año de tratamiento en es estudio de los polimorfismos CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223. No obstante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo OPRM1 rs1799971. Tanto el estudio de dominancia como el de co-dominancia recesiva nos mostró que ser portador del genotipo GG del polimorfismo OPRM1 rs1799971 confiere una mayor probabilidad de que el tratamiento con TSN sea eficaz.

Tabla 9: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con TSN en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	SÍ Abstinencia	p-valor	OR (IC=95%)
OPRM1 rs1799971	AA	102 (70,3%)	50 (58,8%)	0,236 0,028	1,00
	AG	40 (27,6%)	28 (32,9%)		1,42 (0,79-2,57)
	GG	3 (2,1%)	7 (8,2%)		4,76 (1,18-19,19)
	AA	102 (70,3%)	50 (58,8%)	0,075 / 0,040	1,00
	AG+GG	43 (29,7%)	35 (41,2%)		4,24 (1,06-16,89)
	AA+AG GG	142 (97,9%) 3 (2,1%)	78 (91,8%) 7 (8,2%)		
CNR1 rs6454674	GG	16 (10,7%)	4 (4,7%)	0,200 0,100	
	GT	59 (40,5%)	33 (38,8%)		
	TT	70 (48,8%)	48 (56,5%)		
	GG	16 (11,0%)	4 (4,7%)	0,230	
	GT+TT	129 (89,0%)	81 (95,3%)		
	GG+GT TT	75 (51,7%) 70 (48,3%)	37 (43,5%) 48 (56,5%)		
CHRNA3 rs1051730	CC	32 (22,1%)	15 (17,6%)	0,683 0,422	
	CT	77 (53,1%)	46 (54,1%)		
	TT	36 (24,8%)	24 (28,2%)		
	CC	32 (22,1%)	15 (17,6%)	0,570	
	CT+TT	113 (77,9%)	70 (82,4%)		
	CC+CT TT	109 (75,2%) 36 (24,8%)	61 (71,8%) 24 (28,2%)		
CHRNA5 rs16969968	AA	32 (22,1%)	15 (17,6%)	0,683 0,422	
	AG	77 (53,1%)	46 (54,1%)		
	GG	36 (24,8%)	24 (28,2%)		
	AA	32 (22,1%)	15 (17,6%)	0,570	
	AG+GG	113 (77,9%)	70 (82,4%)		
	AA+AG GG	109 (75,2%) 36 (24,8%)	61 (71,8%) 24 (28,2%)		
CHRNB4 rs17487223	CC	32 (22,1%)	23 (27,1%)	0,260 0,392	
	CT	74 (51,0%)	47 (55,3%)		
	TT	39 (26,9%)	15 (17,6%)		
	CC	32 (22,1%)	23 (27,1%)	0,110	
	CT+TT	113 (77,9%)	62 (72,9%)		
	CC+CT TT	106 (73,1%) 39 (26,9%)	70 (82,6%) 15 (17,6%)		

3.3. *Tratamiento con Bupropion*

En el estudio de la distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 de los fumadores que recibieron como tratamiento de deshabituación tabáquica bupropion (tabla 10), los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la abstinencia al año de tratamiento.

Tabla 10: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con bupropion en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valores fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	SÍ Abstinencia	p-valor
OPRM1 rs1799971	AA	44 (62,9%)	49 (63,6%)	0,865
	AG	25 (35,7%)	26 (33,8%)	
	GG	1 (1,4%)	2 (2,6%)	
	0,922	AA	44 (62,9%)	49 (63,9%)
		AG+GG	26 (37,1%)	28 (36,4%)
		0,617	AA+AG	69 (98,6%)
CNR1 rs6454674	GG	4 (5,7%)	5 (6,5%)	0,870
	GT	33 (47,1%)	33 (42,9%)	
	TT	33 (47,1%)	39 (50,6%)	
	0,844	GG	4 (5,7%)	5 (6,5%)
		GT+TT	66 (94,3%)	72 (93,5%)
		0,671	GG+GT	37 (52,9%)
CHRNA3 rs1051730	CC	18 (25,7%)	15 (19,5%)	0,157
	CT	28 (40,0%)	43 (55,8%)	
	TT	24 (34,3%)	19 (24,7%)	
	0,366	CC	18 (25,7%)	15 (19,5%)
		CT+TT	52 (74,3%)	62 (80,5%)
		0,201	CC+CT	46 (65,7%)
CHRNA5 rs16969968	TT	24 (34,3%)	19 (24,7%)	0,157
	AA	18 (25,7%)	15 (19,5%)	
	AG	28 (40,0%)	43 (55,8%)	
	0,366	GG	24 (34,3%)	19 (24,7%)
		AA	18 (25,7%)	15 (19,5%)
		0,201	AG+GG	52 (74,3%)
CHRNB4 rs17487223	AA+AG	46 (65,7%)	58 (75,3%)	0,470
	GG	24 (34,3%)	19 (24,7%)	
	CC	22 (31,4%)	20 (26,0%)	
	0,465	CT	32 (45,7%)	43 (55,8%)
		TT	16 (22,9%)	14 (18,2%)
		0,482	CC	22 (31,4%)
0,482	CT+TT	48 (68,6%)	57 (74,0%)	
	CC+CT	54 (77,1%)	63 (81,8%)	
	TT	16 (22,9%)	14 (18,2%)	

3.4. *Tratamiento con Vareniclina*

Los resultados del estudio genotípico de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 de los fumadores que recibieron como tratamiento de deshabituación tabáquica la vareniclina, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (tabla 11).

Tabla 11: Distribución genotípica de los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 tratados con vareniclina en función de la abstinencia conseguida al año de tratamiento. Los p-valoros fueron ajustados por edad, sexo y TF.

SNP	Genotipo	NO abstinencia	SÍ Abstinencia	p-valor	
OPRM1 rs1799971	AA	48 (72,7%)	27 (58,7%)	0,146	
	AG	16 (24,2%)	14 (30,4%)		
	GG	2 (3,0%)	5 (10,9%)		
		AA	48 (72,7%)	27 (58,7%)	0,120
		AG+GG	18 (27,3%)	19 (41,3%)	
		AA+AG	64 (97,0%)	41 (89,1%)	0,092
GG	2 (3,0%)	5 (10,9%)			
CNR1 rs6454674	GG	4 (6,1%)	3 (6,5%)	0,983	
	GT	24 (36,4%)	16 (34,8%)		
	TT	38 (57,6%)	27 (58,7%)		
		GG	4 (6,1%)	3 (6,5%)	0,921
		GT+TT	62 (93,9%)	43 (93,5%)	
		GG+GT	28 (42,4%)	19 (41,3%)	0,906
TT	38 (57,6%)	27 (58,7%)			
CHRNA3 rs1051730	CC	16 (24,2%)	13 (28,3%)	0,891	
	CT	27 (40,9%)	18 (39,1%)		
	TT	23 (34,8%)	15 (32,6%)		
		CC	16 (24,2%)	13 (28,3%)	0,633
		CT+TT	50 (75,8%)	33 (71,7%)	
		CC+CT	43 (65,2%)	31 (67,4%)	0,805
TT	23 (34,8%)	15 (32,6%)			
CHRNA5 rs16969968	AA	16 (24,2%)	13 (28,3%)	0,891	
	AG	27 (40,9%)	18 (39,1%)		
	GG	23 (34,8%)	15 (32,6%)		
		AA	16 (24,2%)	13 (28,3%)	0,633
		AG+GG	50 (75,8%)	33 (71,7%)	
		AA+AG	43 (65,2%)	31 (67,4%)	0,805
GG	23 (34,8%)	15 (32,6%)			
CHRNB4 rs17487223	CC	22 (33,3%)	14 (30,4%)	0,501	
	CT	29 (43,9%)	17 (37,0%)		
	TT	15 (22,7%)	15 (32,6%)		
		CC	22 (33,3%)	14 (30,4%)	0,747
		CT+TT	44 (66,7%)	32 (69,6%)	
		CC+CT	51 (77,3%)	31 (67,4%)	0,245
TT	15 (22,7%)	15 (32,6%)			



DISCUSIÓN

1. Estudio epidemiológico y clínico de los pacientes.

El tabaco es una de las mayores amenazas para la salud pública que está afrontando el mundo. Es la causa de muerte de más de 7 millones de personas al año, de las cuales más de 6 millones son consumidores directos y alrededor de 900.000 son fumadores pasivos expuestos al humo ajeno. La mayoría de los fumadores que conocen los peligros del tabaco desean dejarlo. Solo 24 países, que representan el 15% de la población mundial, disponen de servicios públicos integrales para ayudar a consumidores a dejar de fumar. No hay ningún tipo de asistencia para dejar de fumar en una cuarta parte de los países de bajos ingresos. El asesoramiento y la medicación pueden aumentar la probabilidad de que un fumador que desea abandonar el tabaco lo consiga. Para optimizar recursos e identificar el mejor tratamiento posible para cada persona, es necesario seguir estudiando el fenotipo de los pacientes, la eficacia de alternativas terapéuticas y la farmacogenética de los tratamientos disponibles (64).

La nicotina es la sustancia del tabaco que causa adicción. Es una sustancia psicoactiva que actúa en la cognición, humor y conducta de los fumadores. El tabaquismo crónico es una conducta compleja, determinada por múltiples causas que tiene componentes adictivos importantes como es el hábito y la búsqueda de placer. Se piensa que la capacidad de generar adicción de una sustancia deriva de su capacidad de activar los denominados sistemas de recompensa cerebrales. En el caso de la nicotina, mediado por un aumento de la liberación de dopamina y por su acción agonista sobre receptores colinérgicos nicotínicos. La estimulación indirecta sobre otros sistemas de neurotransmisión, como el noradrenérgico y el cannabinoide, se relaciona también con sus propiedades reforzadoras (18). Dado que la vía pulmonar produce efectos centrales en unos diez segundos, cada calada produce un discreto reforzamiento. A diez caladas por cigarrillo, un fumador refuerza diariamente unas 200 veces el hábito (más de 70.000 al año). El lugar, el momento y la actividad asociada al fumar quedan así relacionados con los estímulos reforzadores de la nicotina (65).

La elección de cualquier farmacoterapia para dejar de fumar debe guiarse por las preferencias, contraindicaciones y precauciones del paciente. Se deben tener en

cuenta factores específicos, como la posibilidad de eventos adversos, posibles interacciones medicamentosas, la experiencia del individuo con la farmacoterapia y la conveniencia, disponibilidad y coste antes de prescribir cualquier intervención farmacológica. También se debe tener en cuenta el nivel de adicción a la nicotina que el individuo tiene según una escala validada como es el TF (24).

En el presente estudio hemos incluido 540 pacientes que acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre Abril del 2001 y Febrero del 2011, para recibir terapia de deshabituación tabáquica siguiendo el protocolo de actuación de la SEPAR. Los pacientes de nuestro estudio están repartidos de forma equilibrada en los dos sexos (54,44% hombres y 45,56% mujeres), con una edad media de $45 \pm 10,86$ años. Analizando tanto la edad como el sexo de los pacientes que consiguieron dejar de fumar, nuestros resultados mostraron que ninguna de estas variables son factores predisponentes. Otros grupos han estudiado la posible relación de las variables edad y sexo con los resultados de abstinencia de fumadores. Según un estudio realizado en Polonia para estudiar posibles factores predictores del éxito del abandono del hábito tabáquico, la tasa de abandono de las mujeres fue del 30,4% y ligeramente superior (37,9%) en los hombres ($p < 0,01$). La edad avanzada, el alto nivel educativo y el conocimiento de las consecuencias para la salud del tabaquismo se asociaron con una mejor tasa de abandono a largo plazo entre ambos sexos. Los exfumadores declararon sus preocupaciones sobre el riesgo para la salud de fumar (60.8%) y el alto precio de los cigarrillos (11.6%) como razones principales para dejar de fumar. Además, aquellos que tenían empleo tenían más del doble de probabilidades de dejar de fumar en comparación con los desempleados, y ser religioso no contribuía a dejar de fumar con éxito (66). Otro estudio realizado en Argentina y Uruguay obtenía resultados similares: tener entre 25 y 34 años y un bajo nivel educativo se asociaron con menores probabilidades de dejar de fumar (67). Para intentar justificar la diferencia de nuestros resultados con los publicados previamente, deberíamos hacer un estudio de la situación socioeconómica de los pacientes incluidos en nuestro estudio pero no disponemos de esos datos.

Con el fin de seleccionar el mejor tratamiento para cada fumador, hay que analizar el tipo de dependencia y la intensidad de la misma. En nuestro estudio hemos utilizado

para analizar la dependencia física de los fumadores el TF. Actualmente se aplica el formato reducido del TF, que es un test breve y sencillo de 6 preguntas. La puntuación oscila de 0-10, de tal manera que a mayor puntuación, mayor dependencia. Además de medir la dependencia física, también tiene un valor terapéutico y pronóstico del éxito de dejar de fumar. A mayor puntuación en el TF, más intensivo debe ser el tratamiento y más riesgo hay de fracaso del mismo (25,68). Los resultados de nuestro estudio muestran que el número de cigarrillos (cantidad de nicotina inhalada) se asocia significativamente con el TF y a su vez, como también se recoge en la bibliografía, un mayor TF se relaciona con un menor tiempo de abstinencia (25). Sin embargo, no encontramos relación significativa entre el número de cigarrillos fumados y el tiempo de abstinencia conseguido, lo cual pone de manifiesto que la adicción a la nicotina no sólo está determinada por la cantidad de nicotina inhalada sino también por otros factores como los psicológicos o educativos.

Varios estudios comparan las eficacias de las diferentes alternativas terapéuticas disponibles. El estudio EAGLES tuvo como objetivo evaluar hasta qué punto las eficacias de las farmacoterapias para dejar de fumar en primera línea varían en función de las características del fumador y analizar las asociaciones entre estas características y los resultados de abstinencia conseguidos. Los resultados muestran que algunas características del fumador, como la historia psiquiátrica, la dependencia del cigarrillo y el uso previo de TSN se asocian con abstinencias más bajas, aunque se abre una importante discusión afirmando que no existen diferencias significativas entre las eficacias de vareniclina, bupropion o TSN (69). Los resultados de nuestro trabajo apoyan esta afirmación: no existen diferencias significativas entre las eficacias de vareniclina, bupropion o TSN. Según nuestros resultados, el único tratamiento que mostró diferencias estadísticamente significativas fue la IM, pero hay que tener en cuenta que, en general, todos los pacientes que reciben cualquier tratamiento farmacológico también reciben como tratamiento implícito de soporte en las consultas de tabaquismo IM conductual. Por esto, después de analizar los diferentes tratamientos utilizados y los resultados de abstinencia de cada uno de ellos, podemos concluir que las eficacias conseguidas con las diferentes opciones terapéuticas son similares. Este resultado sustenta la hipótesis de que los fumadores que intentan abandonar el tabaquismo necesitan un estado emocional estable ya que la alteración de factores socioeconómicos o psicológicos dificultan este objetivo

(66,67), por todo ello una IM conductual de soporte ayuda a que los pacientes alcancen un estado emocional estable permitiendo esto un mayor éxito en la capacidad de dejar de fumar.

Es interesante estudiar la eficacia de los tratamientos disponibles en función de la edad y el sexo para orientar el tratamiento del tabaquismo a mejores resultados de abstinencia. Nuestros resultados mostraron que el sexo no es un factor determinante en el éxito de un determinado tratamiento. En el caso del tratamiento con IM, TSN y bupropion la edad tampoco está relacionada con el éxito del tratamiento, por el contrario sí que observamos que el tratamiento con vareniclina es más eficaz en los pacientes de mayor edad. En esta línea, un reciente estudio prospectivo realizado en Japón ha comparado la eficacia de la vareniclina y la TSN como tratamientos de deshabituación tabáquica en dos grupos de edad (fumadores de 25-50 años y otro grupo de ≥ 50 años). Sus resultados son similares a los nuestros y mostraron que la eficacia de ambos tratamientos fue mayor en el grupo de paciente mayores de 50 años (70). Probablemente nosotros no observamos diferencias estadísticamente significativas en el éxito del tratamiento con TSN porque la edad de nuestros pacientes tratados con TSN no supera los 45 años. Al igual que en nuestro estudio, el sexo tampoco influyó en los resultados de abstinencia.

2. Estudios de asociación alélica de los genes OPRM1, CNR1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRN4 en el proceso de deshabituación tabáquica y en la efectividad del tratamiento utilizado.

La variabilidad genética que condiciona la respuesta a los fármacos es la base de la farmacogenética. Un mismo tratamiento produce una gran variabilidad interindividual en la respuesta farmacológica. Con el fin de alcanzar la máxima eficacia y evitar los efectos secundarios de la administración de fármacos, se estudian perfiles genéticos constituidos por los denominados SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que en algunos casos nos permitirán predecir la respuesta de cada

paciente a un determinado fármaco. Es decir, podremos seleccionar a los pacientes según su respuesta terapéutica y ésta influirá a su vez en el desarrollo clínico de nuevos fármacos de manera más específica y sencilla (62).

Cada individuo es portador de cerca de 20 mil genes, a partir de los cuales se generan diferentes productos proteicos que, a su vez, contribuyen a la formación de las características tanto biológicas como conductuales de los individuos. Por otro lado, aún no sabemos cuántos genes podrían contribuir a una enfermedad o a una conducta en particular. Además, todavía hay que aclarar la manera en la que el ambiente determina nuestra conducta, punto determinante en el caso las adicciones como el tabaquismo (71).

Las metas inmediatas de la investigación en genética del tabaquismo son probar las hipótesis sobre las influencias genéticas y no genéticas en el inicio de la conducta de fumar, la adicción a la nicotina, la persistencia de dicha conducta y la eficacia de los tratamientos utilizados en la deshabituación tabáquica. A largo plazo, sería importante proveer información necesaria para desarrollar mejores estrategias de prevención y tratamiento del tabaquismo, y poder enfocarlos a subgrupos de fumadores o individuos en riesgo. El uso de la investigación genética para seguir de cerca el tipo e intensidad del tratamiento para los fumadores es más útil que considerar a todos los fumadores iguales y tratarlos del mismo modo. Por ello, actualmente es crucial estudiar la farmacogenética para predecir la respuesta terapéutica en los pacientes en deshabituación tabáquica y elegir el más idóneo para cada uno (71).

La nicotina es el principal psicoactivo del tabaco y debe sus propiedades adictivas al aumento de la liberación de dopamina en los circuitos de recompensa y a su acción agonista sobre receptores colinérgicos nicotínicos (18). Por ello, nos planteamos los objetivos de caracterizar si variaciones en las secuencias nucleotídicas de los genes OPRM1 (implicado en el sistema opioide); CHRNA3, CHRNA5 y CHRNA4 (implicados en el sistema colinérgico), y del gen CNR1 (implicado en el sistema cannabinoide) modifican la capacidad de deshabituación tabáquica de los pacientes, y estudiar si condicionan la efectividad de los tratamientos utilizados en los procesos de deshabituación tabáquica. Hemos estudiado los polimorfismos OPRM1

rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 en nuestra cohorte de 540 pacientes que acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca para recibir terapia de deshabituación tabáquica.

En todo paciente que acude a la consulta de deshabituación tabáquica hay que analizar el tipo de dependencia y la intensidad de la misma. En nuestro estudio hemos utilizado para analizar la dependencia física de los fumadores a la nicotina el TF. Por ello el primer estudio que llevamos a cabo fue analizar si variaciones en los genes OPRM1, CNN1, CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 se asociaban con diferentes valores del TF. Nuestros resultados mostraron que los polimorfismos OPRM1 rs1799971, CNR1 rs6454674, CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 son independientes de los valores de TF. Aún así, nuestros resultados mostraron una asociación entre el TF y la capacidad de dejar de fumar; por ello, el p-valor del resto de análisis estadísticos realizados se ajustó por el TF. Puesto que también hay estudios que señalan que la edad y sexo influyen en la capacidad de dejar de fumar, también hemos ajustado el p-valor en función del sexo y la edad de los pacientes.

2.1- Sistema cannabinoide

El sistema cannabinoide regula la liberación de glutamato y GABA e interactúa con neuropéptidos relevantes en la motivación y por lo tanto en fenómenos de adicción (péptidos opioides y factor de liberación corticotropo) (54). La variación genómica CB1/CNR1 parece desempeñar un papel en la vulnerabilidad a la adicción humana (55). El gen CNR1, localizado en el cromosoma 6q15 codifica el receptor cannabinoide CB1, responsable del efecto psicoactivo del cannabis y la nicotina (72). Los receptores cannabinoide son miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G, que inhiben la actividad de adenilato ciclasa de una manera dependiente de la dosis. Tras la activación del receptor CB1, disminuye la concentración intracelular de AMPc al inhibir la producción de la adenilato ciclasa, e incrementa la concentración de proteína quinasa activada por mitógenos. La proteína CB1 regula los sistemas neurobiológicos endocannabinoide y dopaminérgico.

Polimorfismos en el gen que codifica al receptor cannabinoide, CNR1, se han asociado previamente con la dependencia de sustancias (73). Diferentes estudios intentan determinar el papel de la variabilidad del gen en la dependencia a otras drogas como cocaína, heroína o cannabis (73–75). En el presente estudio hemos estudiado la distribución genotípica del polimorfismo CNR1 rs6454674 en pacientes que acuden a una consulta de deshabituación tabáquica. Este polimorfismo supone un cambio G>T en una región intrónica del gen CNR1. Nuestros resultados no mostraron asociación significativa entre la distribución genotípica de este polimorfismo y una mayor probabilidad de conseguir la abstinencia. Diversos estudios ya han relacionado al polimorfismo CNR1 rs6454674 con adicción a diversas sustancias como son el alcohol (76), la cocaína (73) o adicciones en general (77); ninguno de estos estudios asocian el polimorfismo CNR1 rs6454674 con la adicción a la nicotina, por lo tanto parece ser que dicha variante alélica del gen CNR1 no condiciona la adicción al tabaco y por lo tanto no modifica la capacidad de dejar de fumar. Nuestros resultados tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica del polimorfismo CNR1 rs6454674 y la mayor o menor efectividad de los tratamientos de deshabituación tabáquica utilizados en la Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Otros polimorfismos del gen CNR1, como rs12021667, rs12027267, rs6702335 y rs12039988 también han sido estudiados en la respuesta de los pacientes a tratamientos de deshabituación tabáquica obteniendo resultados similares a los nuestros (78). Por lo tanto, con lo descrito hasta el día de hoy, variaciones alélicas en el gen CNR1 no modificarían la respuesta a los tratamientos de deshabituación tabáquica.

2.2- Sistema colinérgico

Los genes que codifican los nAChR son candidatos para albergar polimorfismos que puedan modificar a la adicción a la nicotina, ya que estos canales iónicos regulados por ligando son el principal sitio de acción de la nicotina en el sistema nervioso central y periférico (79). Las conexiones neuronales bidireccionales entre la amígdala basolateral (BLA) y las regiones del cerebro, como el *núcleo accumbens*, la corteza prefrontal, el hipocampo y las regiones del cerebro posterior, regulan la motivación, la cognición y las respuestas al estrés. Esta neurotransmisión implica directamente al

sistema colinérgico en las adicciones, concretamente a la nicotina mediante su principal unión con los nAChR (80). La nicotina ejerce sus funciones fisiológicas y farmacológicas en el cerebro a través de nAChR, que son canales iónicos dependientes de ligandos que consisten en cinco subunidades que abarcan la membrana y que modulan la liberación de diferentes neurotransmisores como dopamina, glutamato y GABA. Teniendo en cuenta que hay 12 subunidades nAChR, es muy probable que las subunidades distintas de $\alpha 4$ y $\beta 2$, que han sido intensamente investigadas, también estén involucradas en la adicción a la nicotina. De acuerdo con esta hipótesis, varios estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han estudiado las variantes genéticas asociadas con la dependencia de nicotina (ND) y los fenotipos relacionados con el tabaquismo, sobre todo los genes *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4*, conjunto de genes localizado en el cromosoma 15 que codifica las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 3$ y $\beta 4$ de nAChR respectivamente (44).

Se ha descrito que existe una correlación de los haplotipos de los genes *CHRNA3* y *CHRNA5* con el tabaquismo. Estos genes se superponen parcialmente cola a cola en su configuración y comparten los extremos 3' en direcciones opuestas en el cromosoma 15q25 junto con el gen *CHRNA4* (figura 9) (81).



*Figura 10: Representación esquemática de la estructura genómica del bucle formado por los genes *CHRNA3/A5/B4* que muestra el solapamiento cola a cola entre el gen *CHRNA5* y *CHRNA3*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. (CEN: centrómero, TEL: telómero) (82).*

Un estudio realizado en población checa, basándose en los resultados previos de estudios en el oeste de Europa, reitera que la dependencia a la nicotina se asocia con los polimorfismos rs578776, rs16969968, rs6474412, rs3733829 y rs4105144 de los genes *CHRNA3-A5-B4* y *CYP2A6/B6* respectivamente, mostrando la asociación más fuerte con el polimorfismo rs16969968 localizado en *CHRNA5* (OR (95%IC) 1.32 (1.08-1.62)) para portadores del alelo A vs GG. Sin embargo, este estudio no

relaciona a dichos polimorfismos con el éxito del tratamiento de deshabituación tabáquica (83). Lo anteriormente descrito nos muestra que algunas variantes en el grupo de genes CHRNA5/A3/B4 están asociadas con la dependencia a la nicotina y la cantidad de tabaco fumado. El polimorfismo rs16969968 en el exón 5 de CHRNA5, que transforma un residuo de ácido aspártico en asparragina en la posición 398 (D398N) de la subunidad $\alpha 5$, está estrechamente relacionado con el polimorfismo rs1051730 del gen CHRNA3, que consiste en un cambio de C>T que supone la mutación silenciosa Y215Y. Por otra parte, el polimorfismo rs578776, localizado en la región 3' UTR del gen CHRNA3 (C>T), también se relaciona con el polimorfismo rs16969968 pero más débilmente (44). Nuestros resultados difieren de los descritos hasta ahora pues no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de los polimorfismos CHRNA3 rs1051730, CHRNA5 rs16969968 y CHRNB4 rs17487223 ni con la capacidad de dejar de fumar ni con el éxito o fracaso de los tratamientos utilizados para favorecer la deshabituación tabáquica. Nuestros resultados nos muestran que dichas variaciones alélicas de genes implicados en la ruta colinérgica no modifican ni la capacidad para dejar de fumar ni modifican el éxito de los tratamientos elegidos en nuestra cohorte de pacientes. Probablemente si analizamos otras variaciones en dichos genes si que encontremos diferencias estadísticamente significativas debido a la importancia de dichos genes y del sistema colinérgico en las adicciones.

2.3- Sistema opioide

El sistema opioide endógeno desempeña un papel importante en las adicciones, ya que sus receptores son activados por diversas drogas de abuso (49). Los receptores opioides δ , derivados de la proencefalina, modulan los efectos reforzantes de la nicotina, mientras que los péptidos opioides derivados de la prodinorfina intervienen en los aspectos aversivos y/o disfóricos de la misma. Además, es necesaria la participación de las encefalinas endógenas y de los receptores opioide μ para que la nicotina induzca sus efectos antinociceptivos agudos y los fenómenos de dependencia física. De los tipos de receptores de opioides μ (μ), δ (δ) y κ (κ), el que induce en mayor grado estos efectos tras su activación es el μ .

El gen OPRM1 codifica al receptor opioide μ (OPRM1). Siendo diana principal de los fármacos y péptidos opioides, el receptor μ juega un papel clave en la respuesta al dolor y la adicción. Es necesaria la participación de las encefalinas endógenas y de los receptores opioide μ para que la nicotina y otras drogas como la cocaína o el alcohol induzcan sus efectos antinociceptivos agudos y los fenómenos de dependencia física a través de la modulación del sistema de dopamina (50).

De los distintos SNPs estudiados en las regiones codificantes del gen OPRM1, el polimorfismo A118G (rs1799971), presente en el exón 1 y causante de la sustitución de aminoácidos Asn40Asp, es la variación más frecuente y más estudiada en diversas poblaciones. Se ha descrito que ser portador del alelo G en la posición 118 del gen OPRM1 podría estar asociado a un menor riesgo de dependencia a varias drogas, incluida la nicotina (50,84). La conclusión de un meta-análisis realizado de acuerdo con las guías *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) concluye que existe una asociación significativa entre el dejar de fumar y ser portador del alelo variante del polimorfismo rs1799971 (modelo de codominancia) (85). También se ha demostrado que los ratones que carecían del receptor OPRM1 no obtenían efectos de recompensa por la administración de nicotina, y el SAN era menor, lo que refuerza la idea de una interacción entre la nicotina, el sistema opioide y la actividad dopaminérgica (34).

El receptor μ interviene también en la adicción al alcohol. En este sentido, un reciente estudio (86) ha relacionado mejores resultados para el abandono del alcohol usando como tratamiento la naltrexona (antagonista opiáceo que se une competitivamente a estos receptores y bloquea el acceso de opiáceos u otros agonistas del sistema) en aquellos pacientes que también fumaban (87). Parece que el uso de nicotina podría ser un predictor destacado de la respuesta al tratamiento del alcoholismo con naltrexona. No obstante, la naltrexona no modificó el uso de cigarrillos durante el estudio y no se relacionó la reducción del consumo de alcohol con cambios en el consumo de tabaco (86). Este resultado puede crear dudas sobre la eficacia de la naltrexona para el tratamiento del tabaquismo (indicación fuera de

ficha técnica), pero hay que tener en cuenta que el objetivo de los participantes no era dejar de fumar sino el dejar de beber.

En el presente estudio hemos estudiado la distribución genotípica del polimorfismo OPRM1 rs1799971 en nuestra cohorte de pacientes. Este polimorfismo supone un cambio de base A>G en la posición 118 del gen OPRM1, lo que implica un cambio de Asn40Asp del receptor. Nuestros resultados mostraron que ser portador del alelo G se asoció con una mayor facilidad para dejar de fumar. Este resultado va en la misma dirección que los descritos anteriormente: ser portador de la variante 118G del gen OPRM1 se asoció con un menor riesgo a la adicción (50,84), por lo que también se podría asociar con una mayor facilidad para dejar de fumar. Según nuestros resultados los pacientes que tienen menor grado de adicción (dependencia física al tabaco), determinado por la variante 118G del gen OPRM1 podrán dejar de fumar más fácil. El receptor μ juega un papel clave en la respuesta al dolor y la adicción: es necesario para que la nicotina u otras drogas induzcan sus efectos antinociceptivos agudos y los fenómenos de dependencia física. Una posible hipótesis es que la presencia del alelo G en la posición 118 podría actuar dificultando la activación del receptor μ por la nicotina u otros opioides, de manera que desencadene una menor adicción y mayor facilidad para dejar de fumar.

Un ensayo clínico realizado con 320 fumadores de ascendencia europea comparó la eficacia de diferentes formas de TSN, nicotina transdérmica (TN) frente a aerosol nasal de nicotina (NS), para determinar la influencia de la variante Asn40Asp del receptor OPRM1 en las abstinencias conseguidas de los pacientes incluidos en el estudio. Los resultados mostraron que los pacientes portadores de la variante mutada fueron más propensos a ser abstinentes al final de tratamiento e informaban menos trastornos del estado de ánimo y aumento de peso (88).

Nuestros resultados también mostraron que ser portador del alelo G del polimorfismo OPRM1 rs1799971 se asocia con un mayor éxito del tratamiento de TSN. El tener un menor grado de adicción a la nicotina, no sólo favorecería el dejar de fumar sino que también podría favorecer el éxito de las terapias basadas en la TNS.

3. Debilidades y perspectivas futuras de nuestro trabajo

En el presente trabajo hemos caracterizado desde un punto de vista epidemiológico y clínico a 540 pacientes que acudieron a la Unidad Especializada de Tabaquismo del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. También hemos analizado la influencia de variantes alélicas de genes implicados en los sistemas cannabinoide, colinérgico y opioide en la capacidad de dejar de fumar y eficacia de los tratamientos utilizados en estos pacientes. Una primera posible debilidad de nuestro trabajo es que el número de pacientes incluido no es suficientemente representativo de la gente que intenta dejar de fumar en nuestra sociedad, por ello en futuros trabajos aumentaremos el número de pacientes de nuestra cohorte.

Nuestros resultados mostraron que ni la edad ni el sexo eran factores que influyeran en la capacidad de deshabituación tabáquica. En estudios publicados previamente si que los señalan como factores relevantes, junto con la influencia de otros factores socioeconómicos como el nivel cultural, nivel de estudios, el tener trabajo y/o la religiosidad de los pacientes. Por ello, una debilidad de nuestro trabajo es la falta de variables socioeconómicas de los pacientes incluidos en nuestro estudio. En futuros estudios será subsanada para así poder estudiar la influencia de dichas variables en la capacidad de dejar de fumar de los pacientes que acuden a la Unidad Especializada de Tabaquismo.

En nuestro trabajo se muestra como los pacientes portadores del genotipo GG del polimorfismo rs1799971 del gen OPRM1 tenían una mayor facilidad para dejar de fumar, también nuestros resultados mostraron que ser portador del genotipo GG del polimorfismo rs1799971 del gen OPRM1 se asoció con un mayor éxito del tratamiento de deshabituación tabáquica basado en la terapia sustitutiva de nicotina. Para confirmar estos resultados habría, en estudios futuros, replicar el análisis en otra muestra diferente de fumadores. En el presente trabajo hemos llevado a cabo un análisis de asociación alélica estudiando posibles polimorfismos candidatos en función de lo revisado en la bibliografía, por ello, en estudios futuros ampliaremos el número de polimorfismos analizados por cada gen y exploraremos la influencia de otros posibles sistemas nerviosos en la capacidad de dejar de fumar.



CONCLUSIONES

Primera. Según nuestros resultados, ni la edad ni el sexo de los fumadores son factores predisponentes para dejar de fumar. Sin embargo, el uso de vareniclina es más efectivo en fumadores mayores de 50 años, lo que nos indica la importancia de la edad de los pacientes a la hora de elegir el tratamiento de deshabituación tabáquica adecuado.

Segunda. Nuestro estudio muestra que los pacientes portadores del genotipo GG del polimorfismo rs1799971 del gen OPRM1 tienen una mayor facilidad para dejar de fumar, lo que refuerza la hipótesis de que tanto como el grado de dependencia del fumador y su capacidad para dejar de fumar están condicionados por factores genéticos.

Tercera. En nuestro trabajo se muestra como los pacientes portadores del genotipo GG del polimorfismo rs1799971 de gen OPRM1 tienen mayores probabilidades de que el tratamiento de deshabituación tabáquica basado en la terapia sustitutiva de nicotina tenga un mayor éxito; lo que pone de manifiesto la importancia de tener en cuenta la variabilidad genética de los pacientes a la hora de elegir un determinado tratamiento, es decir, la importancia de la farmacogenética.



BIBLIOGRAFÍA

1. The tobacco atlas.pdf [Internet]. [citado 23 de octubre de 2017]. Disponible en: http://3pk43x313ggr4cy0lh3tctjh.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2015/03/TA5_2015_WEB.pdf
2. Organización Mundial de la Salud. Tabaco. Nota descriptiva N.339. Julio, 2015. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>.
3. Hablemos del tabaco | Gestió de Serveis Sanitaris. Hospital Santa Maria [Internet]. [citado 23 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.gss.cat/es/taquismo/hablemosdeltabaco>
4. Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2008. Plan de medidas MPOWER [Internet]. [citado 24 de octubre de 2017]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43897/1/9789243596280_spa.pdf
5. Informe OMS sobre la epidemia mundial del tabaquismo, 2017 [Internet]. [citado 24 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258599/1/WHO-NMH-PND-17.4-spa.pdf?ua=1>
6. ndp_semana-sin-humo.pdf [Internet]. [citado 25 de marzo de 2018]. Disponible en: https://www.semfcy.es/wp-content/uploads/2017/09/ndp_semana-sin-humo.pdf
7. Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Martín Moreno JM, González Enríquez J, Villar Álvarez F, Guasch Aguilar A. Proyección del impacto del hábito tabáquico sobre la salud de la población española y de los beneficios potenciales de su control.
8. González Enríquez J, Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Martín Moreno JM. Tendencia de la mortalidad atribuible al tabaquismo en España, 1978-1992: 600.000 muertes en 15 años.
9. Encuesta tabacosemFYC 2017.pdf [Internet]. [citado 24 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://www.semfcy.es/wp-content/uploads/2017/05/TABACO-ENCUESTA.pdf>
10. 2016_ESTUDES_2014-2015.pdf [Internet]. [citado 23 de octubre de 2017]. Disponible en: http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2016_ESTUDES_2014-2015.pdf
11. curso de tabaquismo para farmacéuticos.
12. Samet JM. Los riesgos del tabaquismo activo y pasivo. Salud Pública México. enero de 2002;44:s144-60.
13. Diseases Related to Smoking | Jerusha Ellis, MScBMC [Internet]. [citado 18 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://jerushaellis.ca/illustrations/diseases-related-to-smoking/>
14. María José Bernabé Barrios. Valor de los polimorfismos del gen CHRNA5 en la adicción al tabaco. Influencia de los mismos en el proceso de adicción y en la terapia de abandono. Universidad de Salamanca; 2012.

15. Gabrielsen ME, Romundstad P, Langhammer A, Krokan HE, Skorpen F. Association between a 15q25 gene variant, nicotine-related habits, lung cancer and COPD among 56 307 individuals from the HUNT study in Norway. *Eur J Hum Genet.* noviembre de 2013;21(11):1293-9.
16. Nicotine Addiction and Your Brain | Jerusha Ellis, MScBMC [Internet]. [citado 18 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://jerushaellis.ca/illustrations/nicotine-addiction-and-your-brain/>
17. Bello S. Tratamiento del Tabaquismo. *Rev Chil Cardiol.* diciembre de 2011;30(3):230-9.
18. Pérez-Rubio G, López-Flores LA, Ramírez-Venegas A, Noé-Díaz V, García-Gómez L, Ambrocio-Ortiz E, et al. Genetic polymorphisms in CYP2A6 are associated with a risk of cigarette smoking and predispose to smoking at younger ages. *Gene.* 10 de septiembre de 2017;628:205-10.
19. Bedialauneta A, De La Rosa L, Ayesta FJ. Control del tabaquismo. *Perspectivas futuras. Trastor Adict.* :125-34.
20. Nicotina y su Efecto Adictivo [Internet]. [citado 1 de febrero de 2018]. Disponible en: https://www.url.edu.gt/otros_sitios/noTabaco/03-01nicotina.htm
21. Jasinska AJ, Zorick T, Brody AL, Stein EA. Dual role of nicotine in addiction and cognition: A review of neuroimaging studies in humans. *Neuropharmacology.* 1 de septiembre de 2014;84:111-22.
22. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:565-98.
23. Pérez Cruz N, Pérez Cruz H, Manchón F, J E. NICOTINA Y ADICCIÓN: UN ENFOQUE MOLECULAR DEL TABAQUISMO. *Rev Habanera Cienc Médicas.* marzo de 2007;6(1):0-0.
24. Carson KV, Brinn MP, Robertson TA, To-A-Nan R, Esterman AJ, Peters M, et al. Current and Emerging Pharmacotherapeutic Options for Smoking Cessation. *Subst Abuse Res Treat.* 2013;7:85.
25. Navas MCB, González FJC, Ruiz JC, Pallares MD, Cavalcanti EE, Crespo MG, et al. Manual SEPAR de procedimientos. Manejo diagnóstico y tratamiento del tabaquismo en la práctica clínica diaria. SEPAR. 2015;32:102.
26. JF CD and E. Validation of English-language versions of three scales measuring attitudes towards smoking, smoking-related self-efficacy and the use of smoking c... - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 31 de enero de 2018]. Disponible en: <https://pubmed.publicaciones.saludcastillayleon.es/pubmed/?term=three+scales+measuring+attitudes+towards+smoking%2C+smoking-related+self-efficacy+and+the+use+of+smoking+cessation+strategies>
27. M. Arroyo Cózar. Una visión global de las terapias sustitutivas con nicotina [Internet]. 2016. Disponible en: *Prev Tab.* 2016; 18(2): 118-119
28. Verdejo García, Antonio. "Craving", impulsividad y adicción al tabaco. *InfoTabac* , boletín 11 [Internet]. [citado 26 de octubre de 2017]. Disponible en:

<http://www.infotabacweb.com/web.asp?mod=boletines&acc=mostrar&id=%7B64C4573B-3E34-4510-9C56-C6BED2648665%7D>

29. FICHA TECNICA ZYNTABAC 150 mg COMPRIMIDOS DE LIBERACION PROLONGADA [Internet]. [citado 25 de octubre de 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/ft/63265/FichaTecnica_63265.html
30. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN INDIVIDUOS CON HÁBITO TABÁQUICO. Universidad de Salamanca; 2002.
31. Hughes JR, Stead LF, Hartmann-Boyce J, Cahill K, Lancaster T. Antidepressants for smoking cessation. En: Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [citado 25 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD000031.pub4/abstract>
32. infac_v16_n1.pdf [Internet]. [citado 23 de octubre de 2017]. Disponible en: https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/infac_v16_n1.pdf
33. FT_106360022.pdf [Internet]. [citado 25 de octubre de 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/106360022/FT_106360022.pdf
34. Cahill K, Lindson-Hawley N, Thomas KH, Fanshawe TR, Lancaster T. Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation. En: Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [citado 25 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006103.pub7/abstract>
35. Pentel P, Malin D. A vaccine for nicotine dependence: targeting the drug rather than the brain. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2002;69(3):193-7.
36. Verde Rello Z, Santiago Dorrego C. [Genetics of the tobacco smoking]. *Med Clin (Barc).* 19 de enero de 2013;140(2):66-7.
37. Barrueco M, Alonso A, González-Sarmiento R. Bases genéticas del hábito tabáquico. *Med Clínica.* 1 de febrero de 2005;124(6):223-8.
38. Changeux J-P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci.* junio de 2010;11(6):389-401.
39. Pineda-Ortiz J, Torrecilla-Sesma M. Mecanismos neurobiológicos de la adicción a drogas. *Trastor Adict.* :13-21.
40. Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest.* mayo de 2003;123(5):1730-9.
41. Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, MacGregor R, et al. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature.* 22 de febrero de 1996;379(6567):733-6.
42. McKinney EF, Walton RT, Yudkin P, Fuller A, Haldar NA, Mant D, et al. Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. *Pharmacogenetics.* agosto de 2000;10(6):483-91.

43. Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: Evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol.* septiembre de 2008;19(5-6):461-84.
44. Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol.* enero de 2016;53(1):472-84.
45. 58232609.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/582/58232609.pdf>
46. Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Common Molecular Substrates of Nicotine and Alcohol Dependence. *Front Psychiatry* [Internet]. 2013 [citado 18 de febrero de 2018];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2013.00029/full>
47. Saccone NL, Schwantes-An T-H, Wang JC, Grucza RA, Breslau N, Hatsukami D, et al. Multiple cholinergic nicotinic receptor genes affect nicotine dependence risk in African and European Americans. *Genes Brain Behav.* octubre de 2010;9(7):741-50.
48. Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet.* 5 de junio de 2009;150B(4):453-66.
49. Galeote González L. Participación del sistema opioide endógeno en la adicción a la nicotina [Internet] [Ph.D. Thesis]. Universitat Pompeu Fabra; 2008 [citado 27 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/7128>
50. OPRM1 opioid receptor mu 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4988>
51. Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 15 de diciembre de 2002;22(24):10935-40.
52. Prestes AP, Marques FZC, Hutz MH, Roman T, Bau CHD. Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2007;114(11):1503-6.
53. Hu S, Brody CL, Fisher C, Gunzerath L, Nelson ML, Sabol SZ, et al. Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Mol Psychiatry.* marzo de 2000;5(2):181-8.
54. Castañé A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology.* octubre de 2002;43(5):857-67.
55. Gamaledin IH, Trigo JM, Gueye AB, Zvonok A, Makriyannis A, Goldberg SR, et al. Role of the Endogenous Cannabinoid System in Nicotine Addiction: Novel Insights. *Front Psychiatry* [Internet]. 25 de marzo de 2015 [citado 29 de marzo de 2018];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373509/>

56. Zhang P-W, 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*. octubre de 2004;9(10):916-31.
57. De Granda-Orive JI, De Granda-Beltrán AM, Segrelles-Calvo G, López-Padilla D, Jiménez-Ruiz CA, Solano-Reina S. Avances y líneas de investigación en el tratamiento y diagnóstico del tabaquismo. *Sanid Mil*. marzo de 2017;73(1):57-65.
58. Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Dupont RT, Crews KM, Somes G, et al. Single- and Multilocus Allelic Variants within the GABAB Receptor Subunit 2 (GABAB2) Gene Are Significantly Associated with Nicotine Dependence. *Am J Hum Genet*. mayo de 2005;76(5):859-64.
59. Cui W-Y, Seneviratne C, Gu J, Li MD. Genetics of GABAergic signaling in nicotine and alcohol dependence. *Hum Genet*. junio de 2012;131(6):843-55.
60. Neurobiología de la nicotina y el óxido nítrico: Una revisión [Internet]. kipdf.com. [citado 29 de marzo de 2018]. Disponible en: https://kipdf.com/neurobiologia-de-la-nicotina-y-el-oxido-nitrico-una-revision_5aae14861723dda8fc2646d8.html
61. eNOS and XRCC4 VNTR variants contribute to formation of nicotine dependence and/or schizophrenia. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 6 de junio de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050484>
62. Oromí Durich J. Farmacogenética: nuevas perspectivas terapéuticas. *Med Integral*. :1-3.
63. who_fctc_indicator_compendium_1st_edition_es.pdf [Internet]. [citado 18 de febrero de 2018]. Disponible en: http://www.who.int/fctc/reporting/who_fctc_indicator_compendium_1st_edition_es.pdf
64. Tabaco [Internet]. World Health Organization. [citado 21 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
65. Pozuelos Estrada J, Martinena Padial E, Monago Lozano I, Viejo Durán I, Pérez Torralba T. Farmacología de la nicotina. *Med Integral*. :409-17.
66. Kaleta D, Korytkowski P, Makowiec-Dąbrowska T, Usidame B, Bąk-Romaniszyn L, Fronczak A. Predictors of long-term smoking cessation: results from the global adult tobacco survey in Poland (2009-2010). *BMC Public Health*. 22 de noviembre de 2012;12:1020.
67. Niedzin M, Gaszyńska E, Krakowiak J, Saran T, Szatko F, Kaleta D. Gender, age, social disadvantage and quitting smoking in Argentina and Uruguay. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 14 de marzo de 2018;25(1):100-7.
68. Hacemos bien el test de Fagerström? - PDF [Internet]. [citado 16 de junio de 2018]. Disponible en: <http://docplayer.es/71341391-Hacemos-bien-el-test-de-fagerstrom.html>
69. West R, Evins AE, Benowitz NL, Russ C, McRae T, Lawrence D, et al. Factors associated with the efficacy of smoking cessation treatments and predictors of smoking abstinence in EAGLES. *Addict Abingdon Engl*. 6 de marzo de 2018;

70. Chang P-Y, Shiu M-N, Yuan Y-T, Chang H-C, Su P-Y, Lan T-H. Comparative effectiveness of varenicline and nicotine replacement therapy for smoking cessation in older and younger smokers: a prospective cohort in Taiwan. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 23 de diciembre de 2017;
71. Nicolini H, Lanzagorta N. El tabaquismo como fenómeno genético. :7.
72. Lu H-C, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry*. 1 de abril de 2016;79(7):516-25.
73. Clarke T-K, Bloch PJ, Ambrose-Lanci LM, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, et al. Further evidence for association of polymorphisms in the CNR1 gene with cocaine addiction: confirmation in an independent sample and meta-analysis. *Addict Biol*. julio de 2013;18(4):702-8.
74. Isir AB, Baransel C, Nacak M. An Information Theoretical Study of the Epistasis Between the CNR1 1359 G/A Polymorphism and the Taq1A and Taq1B DRD2 Polymorphisms: Assessing the Susceptibility to Cannabis Addiction in a Turkish Population. *J Mol Neurosci MN*. abril de 2016;58(4):456-60.
75. Proudnikov D, Krosiak T, Sipe JC, Randesi M, Li D, Hamon S, et al. Association of polymorphisms of the cannabinoid receptor (CNR1) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) genes with heroin addiction: impact of long repeats of CNR1. *Pharmacogenomics J*. junio de 2010;10(3):232-42.
76. Bühler K-M, Huertas E, Echeverry-Alzate V, Giné E, Moltó E, Montoliu L, et al. Risky alcohol consumption in young people is associated with the fatty acid amide hydrolase gene polymorphism C385A and affective rating of drug pictures. *Mol Genet Genomics MGG*. junio de 2014;289(3):279-89.
77. Dinu IR, Popa S, Bîcu M, Moța E, Moța M. The implication of CNR1 gene's polymorphisms in the modulation of endocannabinoid system effects. *Romanian J Intern Med Rev Roum Med Interne*. 2009;47(1):9-18.
78. Lee W, Bergen AW, Swan GE, Li D, Liu J, Thomas P, et al. Gender-stratified gene and gene-treatment interactions in smoking cessation. *Pharmacogenomics J*. diciembre de 2012;12(6):521-32.
79. Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausern A, Dunn DM, Matsunami N, et al. A candidate gene approach identifies the CHR5A5-A3-B4 region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet*. 11 de julio de 2008;4(7):e1000125.
80. Sharp BM. Basolateral Amygdala, Nicotinic Cholinergic Receptors, and Nicotine: pharmacological effects and addiction in animal models and humans. *Eur J Neurosci*. 26 de mayo de 2018;
81. Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, et al. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry*. abril de 2008;13(4):368-73.
82. Duga S, Soldà G, Asselta R, Bonati MT, Dalprà L, Malcovati M, et al. Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor

- CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet.* 2001;46(11):640-8.
83. Hubacek JA, Pankova A, Stepankova L, Zvolska K, Adamkova V, Lanska V, et al. SNPs within CHRNA5-A3-B4 and CYP2A6/B6 are associated with smoking dependence but not with tobacco dependence treatment outcomes in the Czech population. *Gene.* 30 de marzo de 2017;606:35-8.
 84. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadée W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem.* 23 de septiembre de 2005;280(38):32618-24.
 85. Kong X, Deng H, Alston T, Kong Y, Wang J. Association of opioid receptor mu 1 (OPRM1) A118G polymorphism (rs1799971) with nicotine dependence. *Oncotarget.* 13 de octubre de 2017;8(48):84329-37.
 86. Anton RF, Latham PK, Voronin KE, Randall PK, Book SW, Hoffman M, et al. Nicotine-Use/Smoking Is Associated with the Efficacy of Naltrexone in the Treatment of Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* abril de 2018;42(4):751-60.
 87. 73938_ft.pdf [Internet]. [citado 7 de julio de 2018]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/73938/73938_ft.pdf
 88. 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(3):184-92.