





**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

---



**TESIS DOCTORAL**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN  
LA VÍA DE LOS MICRO-ARN Y SU  
RELACIÓN CON EL ALCOHOLISMO**

---

**IGNACIO NOVO VELEIRO**

**2014**







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

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

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por D. Ignacio Novo Veleiro, titulado **“POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA VÍA DE LOS MICRO-ARN Y SU RELACIÓN CON EL ALCOHOLISMO”**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenido suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al **GRADO DE DOCTOR** por la **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 20 de febrero de 2014.

Fdo. Prof. Dr. Francisco Javier Laso Guzmán Prof. Dr. Miguel Marcos Martín





*A mi familia*



Quiero expresar mi agradecimiento:

A Lucía, por su incondicional apoyo y comprensión.

Al Profesor Dr. Francisco Javier Laso Guzmán, por su confianza y convicción de que podría superar este reto.

Al Profesor Dr. Miguel Marcos Martín, por estar siempre disponible para resolver cualquier duda, por sus sabios consejos e inagotable paciencia y por todo el tiempo que le he robado a lo largo de los últimos meses.

A los Profesores Drs. Rogelio González Sarmiento e Isabel Pastor Encinas, por facilitarme la labor en un ambiente tan ajeno para mí como era un laboratorio.

A la Dra. Clara Ciella Borrella, por guiarme en mis primeros pasos en un laboratorio y estar siempre dispuesta a responder a mis innumerables preguntas.



# ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN	1
Importancia del consumo de alcohol	3
El consumo de alcohol en España	4
Consecuencias del consumo de alcohol en España	6
Consumo de riesgo, abuso y dependencia	7
Mecanismos de lesión inducida por el etanol: inflamación y daño tisular	10
Alcohol e inflamación hepática	11
Efecto tóxico directo del etanol	12
Activación del sistema inmune por el alcohol	13
Alcohol y neuroinflamación	16
Papel del micro-ARN en la inflamación vinculada al consumo de alcohol	18
Inflamación y micro-ARN	20
Alcohol y micro-ARN	23
Vulnerabilidad genética en el desarrollo de alcoholismo y EHA	26
Estudios genéticos de asociación en la dependencia alcohólica	28
Estudios genéticos de asociación en la EHA	29
Polimorfismos genéticos en la vía del micro-ARN	30
Polimorfismo 60 C>G del gen <i>MIR146A</i> (rs2910164)	32
Polimorfismo 78 C>T del gen <i>MIR196A2</i> (rs11614913)	33
Polimorfismo 3377 T>G del gen <i>KRAS</i> (rs61764370)	33

Polimorfismo 2124 G>T del gen <i>IL12B</i> (rs1368439)	35
Polimorfismo 5000C>T del gen <i>IL16</i> (rs1131445)	35
Polimorfismo 3114 C>T del gen <i>IL1R1</i> (rs3917328)	36
Polimorfismo 3400 A>G del gen <i>NFKB1</i> (rs4648143)	37
<b>OBJETIVOS</b>	39
<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	43
Muestra objeto de estudio	45
Selección de genes candidatos	47
Genotipado del ADN	48
Obtención del ADN	48
Obtención de células mononucleadas	48
Purificación del ADN	49
Cuantificación del ADN	49
Análisis genético del ADN obtenido	50
Condiciones de la PCR para los polimorfismos genéticos analizados	53
Polimorfismo 60 C>G del gen <i>MIR146A</i> (rs2910164)	55
Polimorfismo 78 C>T del gen <i>MIR196A2</i> (rs11614913)	56
Polimorfismo 2124 G>T del gen <i>IL12B</i> (rs1368439)	57
Polimorfismo 5000C>T del gen <i>IL16</i> (rs1131445)	58
Polimorfismo 3114 C>T del gen <i>IL1R1</i> (rs3917328)	59
Polimorfismo 3400 A>G del gen <i>NFKB1</i> (rs4648143)	60
Polimorfismo 3377 T>G del gen <i>KRAS</i> (rs61764370)	61

Métodos estadísticos	63
<b>RESULTADOS</b>	<b>67</b>
Análisis de polimorfismos genéticos	69
Polimorfismo 60 C>G del gen <i>MIR146A</i> (rs2910164)	69
Polimorfismo 78 C>T del gen <i>MIR196A2</i> (rs11614913)	73
Polimorfismo 3377 T>G del gen <i>KRAS</i> (rs61764370)	74
Polimorfismo 2124 G>T del gen <i>IL12B</i> (rs1368439)	77
Polimorfismo 5000C>T del gen <i>IL16</i> (rs1131445)	79
Polimorfismo 3114 C>T del gen <i>IL1R1</i> (rs3917328)	81
Polimorfismo 3400 A>G del gen <i>NFKB1</i> (rs4648143)	84
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
Validez de los estudios de asociación genética	89
Presencia de factores de confusión	89
Estratificación poblacional	90
Clasificación de casos y controles	91
Selección de genes candidatos	92
Obtención y procesamiento de las muestras	93
Interpretación de los resultados	94
Relación directa polimorfismo-enfermedad	95
Relación indirecta polimorfismo-enfermedad	97
Ausencia de relación polimorfismo-enfermedad	99
Análisis estadístico	99

Ajuste del valor de P	100
Potencia estadística de nuestro estudio	101
Polimorfismos genéticos estudiados	102
Polimorfismo 60 C>G del gen <i>MIR146A</i> (rs2910164)	102
Polimorfismo 78 C>T del gen <i>MIR196A2</i> (rs11614913)	104
Polimorfismo 3377 T>G del gen <i>KRAS</i> (rs61764370)	105
Polimorfismo 2124 G>T del gen <i>IL12B</i> (rs1368439)	107
Polimorfismo 5000C>T del gen <i>IL16</i> (rs1131445)	108
Polimorfismo 3114 C>T del gen <i>IL1R1</i> (rs3917328)	109
Polimorfismo 3400 A>G del gen <i>NFKB1</i> (rs4648143)	110
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXO I	143
ANEXO II	157







# *INTRODUCCIÓN*

---



## **IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE ALCOHOL**

Históricamente, el inicio de la elaboración y consumo de bebidas alcohólicas por el ser humano se sitúa en la Edad de Piedra, dado que se han hallado restos de bebidas fermentadas en vasijas de 9000 años de antigüedad<sup>1</sup>. Asimismo, en excavaciones arqueológicas de asentamientos humanos en Oriente Medio se han encontrado datos que indican que se recolectaban uvas para la elaboración de vino desde hace, por lo menos, 8000 años<sup>2</sup>. Los efectos embriagadores de estas bebidas, así como su poder antiséptico y la seguridad que este le confería a su consumo, hicieron que diferentes culturas utilizaran las bebidas alcohólicas como bebida habitual de consumo diario, además de como droga y elemento fundamental en las relaciones sociales. Todo esto se ve reflejado en las múltiples referencias a su consumo en escritos egipcios, griegos y romanos, así como en la Biblia. Dependiendo de la localización geográfica de cada pueblo, los ingredientes utilizados para la elaboración de la bebida alcohólica podían variar, desde la uva en Oriente Medio a diferentes frutas y hierbas en el antiguo Egipto<sup>3</sup> o el cacao en Centroamérica<sup>4</sup>, pero siempre con fines similares.

Tras el descubrimiento del proceso de destilación por los árabes en la Edad Media, comenzaron a producirse bebidas de mayor graduación, siendo denominadas con la palabra *al-khul* o *al-ghaul* ("el espíritu", "sustancia pulverizada" o "líquido destilado"), término del que proviene la actual palabra *alcohol*.

Los efectos nocivos del consumo de alcohol se conocen también desde la antigüedad, persistiendo el debate entre defensores y detractores del mismo desde entonces. Hoy en día es posible afirmar que el consumo de alcohol supone un importante problema de salud, asociándose a numerosas enfermedades. Según un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud en 2002, el 4% de la morbilidad mundial, entendida como años de vida perdidos ajustados por discapacidad,

y el 3,2% de la mortalidad mundial (1,8 millones de muertes) es atribuible al consumo de alcohol<sup>5</sup>. Este dato ha sido confirmado en estudios sobre población española, representando la mortalidad atribuida al alcohol entre el 2 y el 2,5% de la mortalidad total en el año 2004<sup>6</sup>.

El conjunto de trastornos asociados al consumo de alcohol abarca alrededor de 60 patologías y problemas sociales derivados del mismo<sup>7</sup>. Entre ellas, cabe destacar las enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, arritmias cardíacas, miocardiopatía), digestivas (hepatitis alcohólica, cirrosis hepática, pancreatitis, neoplasias), neurológicas (encefalopatía de Wernicke, polineuropatía, degeneración cerebelosa) o psiquiátricas (psicosis, dependencia alcohólica). De igual forma, se encuentra relacionado con episodios de violencia doméstica, suicidios y accidentes tanto de tráfico como laborales<sup>8</sup>.

### **EL CONSUMO DE ALCOHOL EN ESPAÑA**

El consumo de alcohol en España se situaba en el año 2005 por debajo de los 10 litros de alcohol por habitante y año, permaneciendo todavía entre los 30 países con mayor consumo del mundo, pero con una clara tendencia descendente tras haber alcanzado un pico de consumo de casi 18 litros por habitante y año en 1980<sup>9</sup>.

Según los datos recogidos en España en la última Encuesta Nacional de Salud, realizada en 2011, alrededor del 66,3% de los españoles afirmaban haber consumido bebidas alcohólicas al menos una vez en el último año, siendo el porcentaje en varones del 78,9% y en las mujeres del 54,2%. El grupo de edad en el que esto era más frecuente correspondía al comprendido entre los 25 y los 64 años. En dicha encuesta, tan sólo un 33,7% de los españoles afirmaban no consumir bebidas alcohólicas nunca, mientras que

un 12,7% admitían un consumo diario de este tipo de bebidas<sup>10</sup>. Estos datos son similares a los correspondientes a la última Encuesta Europea de Salud, publicada en 2009<sup>11</sup>. En lo que respecta a la Comunidad Autónoma de Castilla y León, los porcentajes son discretamente inferiores y han sufrido un descenso paulatino en los últimos años: el 60,3% del global de la población (74% de los varones y 46,9% de las mujeres) admitían el consumo de alcohol en, al menos, una ocasión en el último año<sup>10</sup>.

La bebida alcohólica más consumida entre aquellos que beben a diario en España es el vino: 15,2% de la población. En lo que se refiere al consumo durante los fines de semana, sin embargo, la bebida más consumida es la cerveza, con un porcentaje de población que afirma consumir cerveza en esos periodos del 42,9%. En cuanto al consumo global, es también la cerveza la bebida alcohólica más consumida en la actualidad en España.

Aunque no se conoce la cifra con exactitud, se estima que alrededor del 5,5% de la población entre 15 y 64 años era bebedora de riesgo en 2005 (definido como consumo superior a 40 g diarios de alcohol en los hombres y 20 g en las mujeres)<sup>12</sup>. En relación con las intoxicaciones etílicas, durante el año 2011 un 41,3 % de los hombres y un 23,5% de las mujeres con edades comprendidas entre los 15 y los 34 años se había emborrachado alguna vez en los últimos 12 meses<sup>13</sup>.

La edad media de inicio en el consumo regular de alcohol en España es de 17,8 años (DE [desviación estándar]=4,2), siendo algo superior en mujeres (18,8 años; DE=5,1) que en hombres (17,1 años; DE=3,2). En lo que respecta al primer contacto con el alcohol e inicio de su consumo puntual, la edad media es mucho menor, situándose en torno a los 14 años. Entre los jóvenes de 14 a 18 años, el 75,1% había probado alguna vez el alcohol en 2010, un 73,6% lo había consumido en el último año y el 63% en el último mes. Precisamente, el consumo de alcohol entre los estudiantes de

este grupo de edad se concentra en el fin de semana y considerando el 63% que había consumido bebidas alcohólicas en los últimos 30 días, un 99,8% lo había hecho en fin de semana. Un 58,8% de los estudiantes de entre 14 y 18 años se había emborrachado alguna vez en la vida y el 35,6% lo había hecho en el último mes<sup>14</sup>. En resumen, el consumo de alcohol se encuentra muy extendido en la población española en todos los grupos de edad, aunque con mayor importancia en los individuos más jóvenes, lo que refleja la gran aceptación social del mismo y el estrecho vínculo que mantiene con los eventos y relaciones sociales.

### **Consecuencias del consumo de alcohol en España**

Según los últimos datos disponibles, en 2008 se produjeron en España 24339 defunciones relacionadas con el consumo de alcohol, aunque la tasa de mortalidad ajustada por edad experimentó una reducción del 25% en hombres y del 21% en mujeres entre 2000 y 2008<sup>15</sup>. El número de muertes atribuibles directamente al consumo de alcohol también se redujo desde el año 2004 (8418 defunciones, 2,3% del total) al año 2008 (1626 muertes)<sup>15</sup>. En Castilla y León estos porcentajes se sitúan por debajo de la media nacional, suponiendo un 1,9% de la mortalidad global. Si analizamos los datos según la causa de la muerte, resulta llamativo que el 40% de las defunciones fueron debidas a accidentes, suicidios y homicidios en los que hubo asociación con el consumo de alcohol<sup>16</sup>. Estos datos, en conjunto, suponían en 2004 un total de 124531 años potenciales de vida perdidos por causas relacionadas con el consumo de alcohol<sup>16</sup>. Si bien las cifras son todavía alarmantes, suponen una clara mejoría con respecto a los años previos, teniendo en cuenta que en los años 80 en España la mortalidad relacionada con el consumo de alcohol se situaba en torno al 5,5-6% del total y en la década de los 90 alrededor del 4,5-5,5%, según la región estudiada<sup>17-20</sup>. Además, estos porcentajes



varían en función del grupo de edad, como muestra un estudio realizado en la ciudad de Barcelona entre 1997 y 2006, en el que se estimó que el porcentaje de muertes atribuibles al alcohol en la población analizada era del 3,3%, ascendiendo hasta el 19,4% en el grupo de edad comprendido entre los 25 y los 34 años<sup>21</sup>. El riesgo de muerte por causas relacionadas con el consumo de alcohol se asocia de forma directa con la cantidad de alcohol consumido. Así, en Europa se estima que un consumo de 60 gramos de alcohol al día supone un riesgo anual de muerte por alguna causa relacionada con el alcohol del 9% para los hombres y del 8% para las mujeres<sup>22</sup>.

La estimación del coste socioeconómico derivado del consumo del alcohol en nuestro país resulta muy complicada, dado que para realizarla es necesario tener en cuenta los datos de mortalidad prematura y años potenciales de vida perdidos, así como el absentismo asociado y las bajas laborales secundarias a los numerosos trastornos, enfermedades y accidentes asociados al consumo de alcohol. Con estas limitaciones, en un estudio realizado en 2007 se estimaba un impacto anual de 2670 millones de euros sobre el sistema productivo español<sup>23</sup>.

## **CONSUMO DE RIESGO, ABUSO Y DEPENDENCIA**

A pesar del constante debate entre defensores y detractores del consumo de alcohol y del posible efecto beneficioso de pequeñas cantidades del mismo sobre cierto tipo de patologías<sup>24</sup>, existe un umbral y unas características de consumo que están claramente asociados al desarrollo de múltiples enfermedades y problemas de salud. La fórmula tradicional de cálculo de la cantidad de alcohol consumida, basándose en el volumen y graduación de las bebidas, ha sido sustituida por otra más simple y estándar para cada país. Así, en la práctica clínica diaria se utiliza la cuantificación del consumo de alcohol en unidades de bebida estándar (UBE). En España, la UBE se corresponde

con 10 gramos de alcohol, es decir, una consumición de vino (100 mL) o cerveza (200 mL), o media consumición de destilados o combinados (25 mL)<sup>25</sup>. De esta forma, podemos cuantificar el consumo de riesgo como más de 2 UBE diarias para las mujeres o más de 4 UBE para los varones, o bien el consumo de más de 17 UBE semanales para las mujeres y de más de 28 UBE para los varones<sup>26</sup>. Estos valores equivalen a los considerados como consumo de riesgo por la OMS y la Comisión Europea: más de 20 gramos de alcohol diarios para las mujeres y 40 gramos para los varones. También se cataloga como bebedor de riesgo a aquella persona que consume gran cantidad de alcohol en poco tiempo (6 o más UBE para los varones y 4 o más UBE para las mujeres en un periodo de dos horas), al menos una vez al mes. Esta conducta se conoce como “consumo concentrado de alcohol”, “consumo en atracones” o “botellón” (*binge drinking*) y es un patrón de consumo habitual de muchos jóvenes en España y otros países europeos<sup>12</sup>.

Otros conceptos importantes son los de abuso y dependencia del alcohol, ambos referidos a un consumo excesivo, inapropiado y potencialmente perjudicial de alcohol pero con criterios y connotaciones diferentes<sup>27,28</sup>. Por un lado, para identificar un consumo abusivo de alcohol el individuo debe haber presentado en los doce meses previos al menos uno de los siguientes síntomas:

- Consumo recurrente que conlleva ausencias repetidas de su puesto de trabajo o incapacidad para ejercer su actividad laboral (o formativa en el caso de un estudiante).

- Consumo recurrente en situaciones que implican un riesgo físico, como la conducción de automóviles o maquinaria.

- Problemas legales derivados del consumo de alcohol, como detenciones o denuncias por desorden público.

-Consumo continuado de alcohol a pesar de la aparición de problemas sociales o en las relaciones interpersonales derivados del mismo (discusiones, peleas, conflictos en la pareja).

-Ausencia de criterios de dependencia alcohólica.

En el caso de la dependencia del alcohol, el individuo debe haber presentado en los doce meses previos al menos uno de los siguientes problemas:

-Desarrollo de tolerancia (necesidad de aumentar el consumo para alcanzar los efectos deseados o ausencia de signos de intoxicación con consumos que previamente sí los provocaban).

-Aparición de síntomas de abstinencia (desarrollo de un síndrome de abstinencia completo o consumo de alcohol para evitar su aparición).

-Pérdida de control sobre el consumo (consumo de mayor cantidad y durante más tiempo del deseado).

-Deseo persistente de consumo de alcohol o imposibilidad para abandonarlo.

-Inversión de gran cantidad de tiempo en actividades destinadas a adquirir alcohol para su consumo o en recuperarse de los efectos del mismo.

-Abandono de actividades sociales, laborales o de ocio para consumir alcohol.

-Consumo continuado de alcohol a pesar de conocer su relación con problemas físicos o psicológicos ya establecidos.

El presente trabajo se ha realizado de acuerdo a estos criterios, vigentes durante el periodo de reclutamiento de pacientes de acuerdo al manual DSM-IV<sup>28</sup>. Sin embargo, consideramos de interés reseñar que en el momento actual, el recientemente publicado manual DSM-V reduce los diagnósticos de abuso y dependencia alcohólica a una única

entidad denominada trastorno por uso de alcohol<sup>29</sup>. Los criterios utilizados para el diagnóstico de esta entidad incluyen la mayor parte de los síntomas y signos clásicamente atribuidos al trastorno por dependencia del alcohol, como el desarrollo de tolerancia al consumo de alcohol, síntomas secundarios a la abstinencia de dicho consumo o pérdida de control sobre el consumo del mismo<sup>29</sup>.

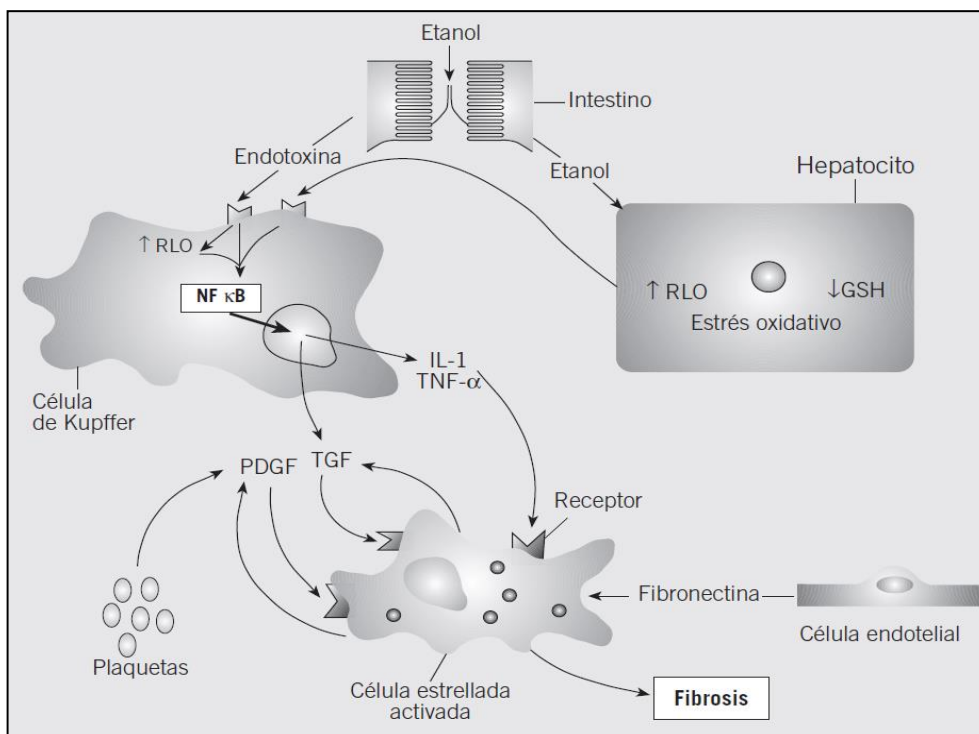
### **MECANISMOS DE LESIÓN INDUCIDA POR EL ETANOL: INFLAMACIÓN Y DAÑO TISULAR**

En los últimos años se ha estudiado extensamente la base fisiopatológica de los diferentes trastornos relacionados con el consumo de alcohol, lo que ha propiciado el descubrimiento de múltiples mecanismos implicados en la lesión orgánica inducida por etanol en órganos y tejidos. Entre estos procesos fisiopatológicos, tiene gran importancia la alteración provocada por el alcohol en el sistema inmune en general y en la respuesta inflamatoria en particular<sup>30</sup>. Mientras que la intervención de la respuesta inmune en el desarrollo de hepatopatía alcohólica es bien conocida<sup>31</sup>, también se ha señalado recientemente que el consumo de alcohol puede inducir neuroinflamación y lesión cerebral, e incluso que estos procesos podrían estar involucrados en el desarrollo de la adicción al alcohol<sup>32</sup>. Acorde con el objetivo general de nuestro trabajo, esta “Introducción” se limita al análisis el efecto del alcohol sobre la respuesta inflamatoria en los tejidos hepático y cerebral, sin profundizar en el resto de trastornos orgánicos relacionados por alcohol.

## Alcohol e inflamación hepática

La enfermedad hepática alcohólica (EHA) abarca la esteatosis hepática, la hepatitis alcohólica y la cirrosis hepática, con una gran variabilidad individual en la susceptibilidad al desarrollo de cada una de ellas. El consumo de alcohol, junto con la infección crónica por virus de la hepatitis C, es en los países occidentales la primera causa de cirrosis hepática, que es la forma más grave de afectación hepática por el alcohol. Los mecanismos fisiopatológicos de la lesión hepática comprenden, por un lado, el efecto tóxico directo del etanol, y por otro, las alteraciones provocadas por el alcohol en el sistema inmune (figura 1). Ambos procesos se encuentran relacionados y, en conjunto, pueden contribuir a esclarecer la fisiopatología de los procesos de necrosis y apoptosis celular, inflamación y fibrosis que provoca el alcohol sobre el tejido hepático.

Figura 1: Mecanismos de lesión hepática inducida por el alcohol.



RLO: radicales libres de oxígeno. NFκB: factor nuclear kappa B. IL-1: interleucina 1. GSH: glutatión. TNFα: factor de necrosis tumoral alfa. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas. TGF: factor de crecimiento transformante. Laso et al<sup>33</sup>.

### *Efecto tóxico directo del etanol*

El 90% del alcohol ingerido se metaboliza en el hígado a través de dos vías: la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH), que utiliza como cofactor el nicotinamín-adenín-dinucleótido (NAD) y la vía del citocromo P450 2E1 (CYP2E1). El producto final de ambas vías es el acetaldehído, que posteriormente es oxidado a acetato en las mitocondrias mediante la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH)<sup>34</sup>. Este metabolismo del etanol condiciona por sí mismo un daño hepatocelular a través de los mecanismos que se detallan a continuación:

#### a) Alteración del metabolismo celular e inducción de estrés oxidativo

En el contexto de un consumo crónico de alcohol, se incrementa el porcentaje de oxidación del mismo a través del CYP2E1, con lo que se generan radicales libres de oxígeno (RLO) que contribuyen a la fibrosis hepática y activan una serie de mediadores proinflamatorios, como el factor nuclear kappa B (NFκB)<sup>35</sup>. Además de por esta vía, la metabolización del alcohol mediada por la enzima ADH también genera RLO en los hepatocitos y el consumo de alcohol induce en las células de Kupffer la producción de óxido nítrico (NO) y la reducción de NAD a NADH<sup>36</sup>. La presencia de estos elementos provoca un daño en las macromoléculas celulares a través de la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN y las proteínas<sup>37</sup>.

#### b) Toxicidad de metabolitos

El acetaldehído generado durante el metabolismo del alcohol es considerado clave en la patogenia de la hepatopatía alcohólica. Esta sustancia se ha relacionado con el daño celular, la inflamación, el remodelado de la matriz extracelular y la fibrogenesis<sup>38</sup>. Su gran capacidad de unión a otras moléculas, formando complejos conocidos como aductos<sup>39</sup>, provoca una modificación de la acción de las mismas, que se

comportan como neoantígenos y podrían desencadenar una reacción inmune mediada por células CD8+ citotóxicas<sup>40</sup>. Además, el acetaldehído está implicado en la estimulación de las células estrelladas hepáticas, que intervienen en el desarrollo de la fibrosis hepática<sup>41</sup>.

c) Aumento de la permeabilidad intestinal

El efecto tóxico del acetaldehído es uno de los responsables del aumento de la permeabilidad intestinal inducido por el alcohol<sup>42</sup>. Y una de las principales consecuencias de esta alteración es el paso al torrente sanguíneo del lipopolisacárido (LPS), o endotoxina, de la pared celular de bacterias Gram negativas<sup>43</sup>. Los complejos formados por el LPS y la proteína de unión al mismo (LBP, *lipopolysaccharide-binding protein*) se unen a los receptores CD14 de las células de Kupffer, activando los receptores de tipo *Toll* 4 (*Toll-like receptors* 4, TLR4). Dicha activación desencadena la producción de numerosas citocinas proinflamatorias a través de la vía del NFκB, entre las que destaca el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα)<sup>44</sup>, que contribuyen al aumento del estrés oxidativo, a la producción de otras citocinas y a la inducción de apoptosis de hepatocitos, perpetuando y favoreciendo la progresión del daño celular hepático<sup>45</sup>.

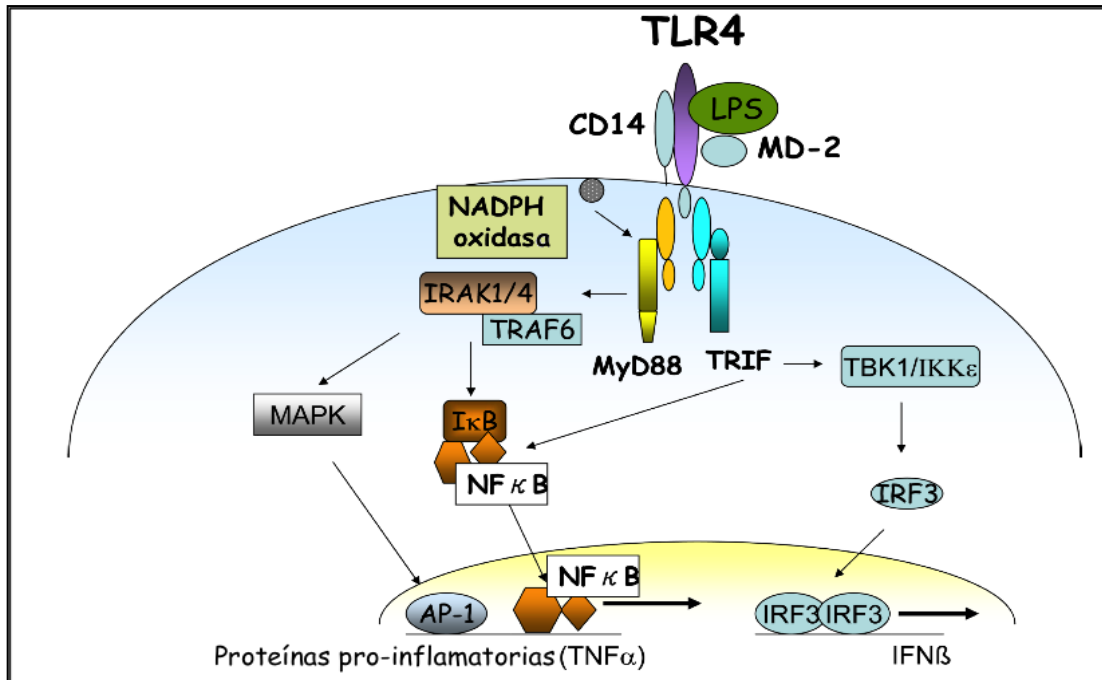
*Activación del sistema inmune por el alcohol*

Los mediadores fundamentales de la activación la respuesta inmune tras el consumo crónico de alcohol son los receptores TLR4, ya citados, presentes en diferentes células del sistema inmune, fundamentalmente del sistema monocito-macrófago.

Como se ha comentado, el aumento de la permeabilidad intestinal inducido por el consumo de alcohol favorece el paso de LPS bacteriano al torrente sanguíneo, capaz de estimular los receptores TLR4, que a su vez desencadenan la activación de la vía del

NFκB. Todo ello conlleva finalmente un aumento en la producción de diferentes citocinas proinflamatorias que inducen la activación del sistema inmune<sup>46</sup>. El proceso de activación de esta vía se refleja en la figura 2, donde se especifican las proteínas y complejos más relevantes que intervienen en el mismo<sup>47-49</sup>.

Figura 2: Vía de activación de la respuesta inflamatoria TLR4/NFκB en macrófagos expuestos a la acción del alcohol.



TLR4: Receptor de tipo *Toll* 4. LPS: lipopolisacárido. CD14: antígeno de diferenciación 14. MD-2: antígeno linfocitario 96 de unión. NADPH: nicotin-adenin-dinucleótido fosfato. IRAK1/4: quinasa asociada al receptor de interleucina 1 tipos 1/4. TRAF6: factor asociado al receptor de TNF tipo 6. MyD88: proteína de diferenciación mieloides 88. TRIF: proteína adaptadora inductora de interferón β. TBK1: quinasa de unión al regulador de retroalimentación negativa 1. IKKε: quinasa de inhibición del factor nuclear kappa B. MAPK: proteína-quinasa activada por mitógenos. IκB: proteína inhibidora del factor nuclear kappa B. NFκB: factor nuclear kappa B. AP-1: proteína activadora tipo 1. IRF3: factor regulador de interferón tipo 3. IFNβ: interferón beta. TNFα: factor de necrosis tumoral alfa. Modificado de Mandrekar y Szabo<sup>49</sup>.

Es interesante destacar que el etanol induce un aumento de la síntesis de los propios receptores TLR<sup>47</sup>, lo que podría constituir un mecanismo de perpetuación de la respuesta inflamatoria inducida por esta sustancia. De igual forma, la muerte hepatocitaria amplifica todavía más esta respuesta, ya que la fagocitosis de restos celulares necróticos por las células de Kupffer aumenta la expresión de NFκB y



TNF $\alpha$ <sup>50</sup>. La importancia de esta vía en la patogenia de la EHA ha sido comprobada a través de estudios realizados en animales de experimentación<sup>51</sup>. Entre ellos, cabe destacar el realizado por Hirtz et al.<sup>52</sup>, que demostró que los ratones *knock-out* para TLR4 estaban protegidos frente al desarrollo de hepatopatía alcohólica.

En este contexto, adquiere relevancia el descubrimiento de nuevas moléculas de RNA de pequeño tamaño, conocidas como micro-ARN y capaces de actuar como moduladores de la respuesta inflamatoria, sobre todo a través de una regulación postranscripcional de la expresión génica, como se detallará más adelante. En el caso de la vía TLR4/NF $\kappa$ B, pueden actuar en varios puntos; por ejemplo, regulando a las quinasas asociadas al receptor de interleucina 1 (IRAK, *interleukin 1 receptor associated kinase*) y 2, al NF $\kappa$ B o al TLR4<sup>53</sup>. En el caso concreto de la EHA, algunas de estas moléculas, como miR-155, se han relacionado con un aumento de la producción de TNF $\alpha$  asociado a la hepatopatía alcohólica<sup>54</sup>. Otras, como miR-122, se han vinculado sobre todo con otros tipos de hepatopatía, aunque probablemente también jueguen un papel en la EHA<sup>55</sup>.

Además del papel clave que desempeña en la EHA el exceso de respuesta inflamatoria mediado por el sistema monocito/macrófago, el alcohol también disminuye la producción de macrófagos<sup>56</sup>, modifica su interacción con los linfocitos T<sup>57</sup> y disminuye el número y la capacidad citotóxica de las células NK en la cirrosis hepática<sup>58</sup>. También es capaz de activar y reclutar hacia el tejido hepático diversas células efectoras del sistema inmune, a través de modificaciones en la expresión de moléculas HLA<sup>59</sup>, la formación de aductos<sup>60</sup> o la secreción aumentada de citocinas como la IL-12<sup>40,61,62</sup>.

Finalmente, entre otros mecanismos, la activación progresiva de las diferentes células que participan en la respuesta inmune inducida por el alcohol a través de las vías

comentadas, termina por activar también a las células estrelladas hepáticas (células de Ito), provocando un desequilibrio entre la formación y degradación de colágeno en la matriz extracelular, lo que conduce al desarrollo de fibrosis hepática<sup>63</sup> (figura 1, página 23). Todos estos procesos están potencialmente modulados por micro-ARN específicos, dado su papel como reguladores clave de la gran mayoría de procesos fisiológicos y patológicos<sup>64-66</sup>.

### **Alcohol y neuroinflamación**

El consumo de alcohol provoca diversas alteraciones a nivel cerebral, con un espectro muy amplio que abarca desde manifestaciones de dependencia y abstinencia del alcohol hasta enfermedades neurológicas degenerativas, como la encefalopatía de Wernicke. En la gran mayoría de ellas se han descrito procesos de neuroinflamación que parecen ser una parte fundamental de su fisiopatología.

Esto no es extraño si consideramos que los procesos de neuroinflamación, además de estar implicados en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer<sup>67</sup>, parecen desempeñar también un papel clave en la fisiopatología de los trastornos adictivos y el abuso de sustancias<sup>68,69</sup>. De hecho, los datos existentes en la actualidad ya apuntan a que la propia adicción al alcohol, al igual que la tolerancia al mismo, podría estar relacionada con procesos inflamatorios a nivel cerebral<sup>70</sup>.

En este sentido, la actividad inflamatoria mediada por la vía de TLR/NFκB parece implicada en la patogenia de las adicciones, dado que se ha demostrado un aumento de la expresión de NFκB en el cerebro, así como de diferentes citocinas proinflamatorias, en pacientes alcohólicos y en adictos a otras sustancias<sup>71,72</sup>. Más concretamente, se ha detectado la producción de TNFα<sup>30</sup> o IL-1β<sup>73</sup> en astrocitos y

células de la glía a través de la vía del NFκB<sup>73</sup> tras su exposición al etanol. Asimismo, se ha observado que, a largo plazo, la respuesta inflamatoria a nivel cerebral inducida por el alcohol es capaz de perpetuarse mediante mecanismos de retroalimentación positiva que incrementan la expresión de receptores de citocinas, TLR y la producción de radicales libres, con el correspondiente aumento del estrés oxidativo<sup>74,75</sup>.

De todos los mecanismos estudiados, la activación de los receptores TLR, presentes en la superficie de células gliales, astrocitos y otras células del sistema nervioso central, es el que ha cobrado mayor relevancia en los últimos años como piedra angular de la neuroinflamación<sup>76,77</sup>; de esta forma, parece jugar un papel capital en la inflamación en el SNC provocada por el consumo de alcohol<sup>78,79</sup>, al igual que sucede en la inflamación asociada con la hepatopatía alcohólica.

De esta forma, la interacción entre el LPS y los receptores TLR4 en el cerebro provoca la síntesis de citocinas proinflamatorias, y el desencadenamiento de procesos neurodegenerativos<sup>80</sup>. Dicha activación se encuentra mediada por proteínas intracelulares como IRAK1, IRAK2 e IRAK4<sup>81</sup> y MyD88<sup>82</sup>, de forma similar a lo descrito en la hepatopatía alcohólica. Además de este mecanismo, en los últimos años varios estudios han demostrado la activación de astrocitos, microglía y macrófagos en cultivos de tejido cerebral inducida directamente por el alcohol a través de los receptores TLR4<sup>83-85</sup>, y también de otros receptores como TLR2 y TLR3<sup>75,76</sup>. Estos hallazgos implican que, a nivel cerebral, el alcohol estimularía estos receptores independientemente de los niveles de LPS bacteriano.

Al igual que ocurre con la inflamación presente en el contexto de la hepatopatía alcohólica, determinados micro-ARN pueden jugar un papel relevante en el control de la neuroinflamación inducida por el alcohol. Esto se ha comprobado recientemente en ratones al estudiar el miR-155<sup>78</sup>, implicado en la inflamación inducida por el consumo

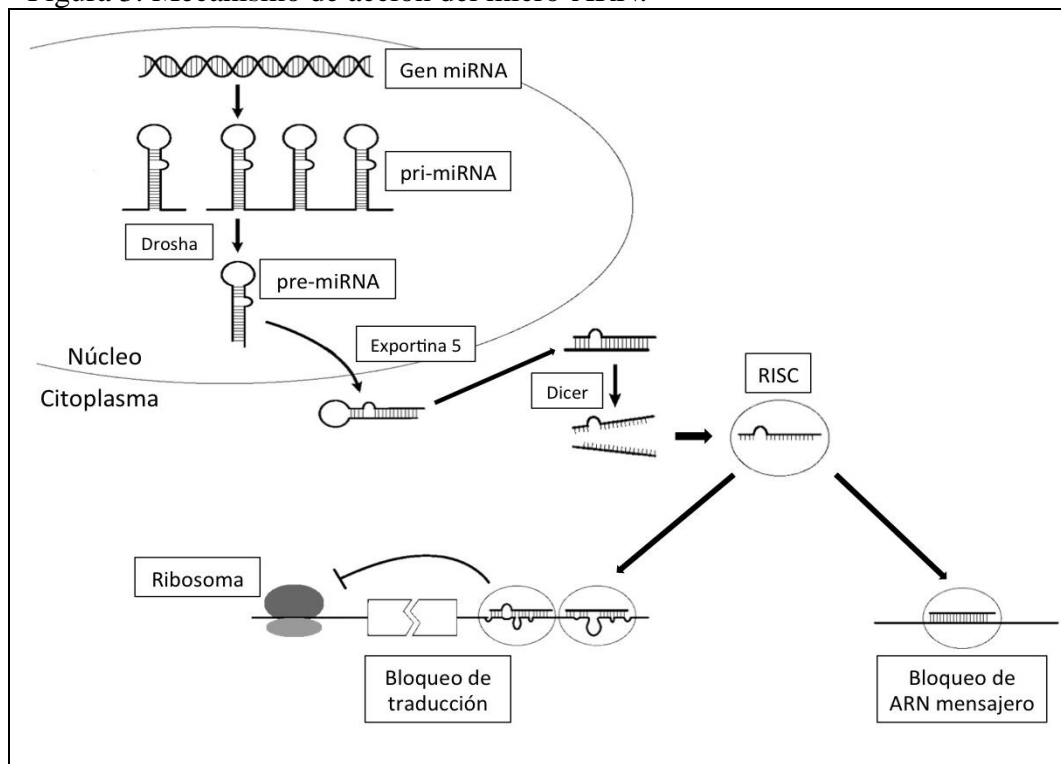
de alcohol a través de la vía del TLR4. En humanos, se ha descrito la presencia de un perfil específico de expresión de micro-ARN en el cerebro de pacientes alcohólicos<sup>86,87</sup> y el hecho de que parte de los micro-ARN sobre- o infra-expresados tengan como dianas potenciales genes que codifican proteínas implicadas en la vía TLR4/NFκB, constituye una importante base para la hipótesis de que los micro-ARN actúen como reguladores de la neuroinflamación inducida por el alcohol.

### **PAPEL DEL MICRO-ARN EN LA INFLAMACIÓN VINCULADA AL CONSUMO DE ALCOHOL**

Las moléculas de micro-ARN son reguladores clave de numerosos procesos biológicos, entre ellos la respuesta inflamatoria. Estas moléculas de ARN fueron descritas inicialmente en *Caenorhabditis elegans* en 2001<sup>88</sup>, y desde entonces numerosos estudios han mostrado su implicación en enfermedades digestivas<sup>89</sup>, neurológicas<sup>90</sup>, cardiovasculares<sup>91</sup>, renales<sup>92</sup>, respiratorias y de otros órganos, fundamentalmente oncológicas<sup>64</sup>.

Los micro-ARN se transcriben a partir de regiones de ácido desoxirribonucleico (ADN), pero no son traducidos a proteínas. Durante su transcripción se sintetizan dos cadenas complementarias que forman una estructura en horquilla de ARN bicatenario, precursora del micro-ARN, que posteriormente es modificado por varias enzimas hasta dar lugar al micro-ARN maduro<sup>93</sup> (figura 3). Posteriormente, llevan a cabo su acción reguladora sobre la expresión génica fundamentalmente por mecanismos post-transcripcionales<sup>65</sup>. En general, se cree que es necesaria la unión de varios micro-ARN a diferentes puntos diana para llevar a cabo su acción. Además, un mismo micro-ARN puede regular la expresión de múltiples genes, cada uno de los cuales puede, a su vez, ser regulado por múltiples micro-ARN<sup>93</sup>.

Figura 3: Mecanismo de acción del micro-ARN.



A partir de los genes que codifican micro-ARN se transcriben precursores que, tras la acción de enzimas como *Drosha*, forman micro-ARN maduro que es exportado al citoplasma. Una vez allí, la enzima *Dicer* procede a la separación de las dos hebras, tras la cual la hebra antisentido se integra en el complejo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*). Una vez activado dicho complejo, puede ejercer su acción reguladora mediante la degradación directa del ARNm o a través del bloqueo de la traducción en los ribosomas.

En muchos casos en los que un determinado micro-ARN está implicado en el desarrollo de una enfermedad, se encuentra un aumento o disminución de su expresión, con el consecuente aumento o disminución de la inhibición de la expresión de otros genes<sup>64</sup>. La detección de la sobre- o infraexpresión de micro-ARN en diferentes enfermedades podría, por tanto, utilizarse como marcador de enfermedad o como factor pronóstico. Así, miR-135 se ha descrito como marcador de cáncer colorrectal<sup>94</sup>; y miR-125 y miR-96 como marcadores pronósticos en hepatocarcinoma o cáncer de próstata<sup>94</sup>, respectivamente.

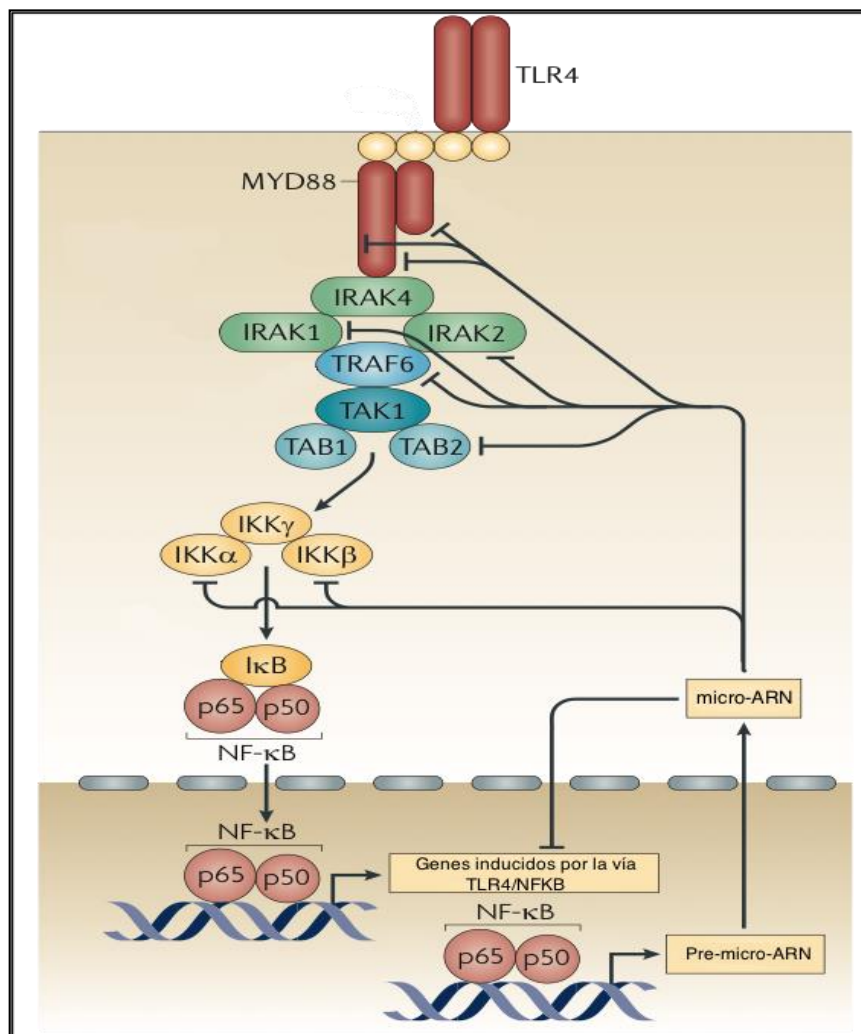
Por otro lado, los micro-ARN pueden ser también dianas terapéuticas, dado que, modificando su expresión, se puede modular la de otros genes implicados en el desarrollo de enfermedades (p. ej., oncogenes). En este campo se han intentado desarrollar fármacos que modulen o bloqueen la expresión de algunos micro-ARN cuya asociación con determinadas enfermedades ha sido probada<sup>95</sup>, y recientemente se ha comunicado la eficacia de un fármaco que inhibe al miR-122 en el tratamiento de la infección por hepatitis C<sup>96</sup>.

### **Inflamación y micro-ARN**

Las diferentes moléculas de micro-ARN desarrollan su acción en prácticamente todos los puntos de la respuesta inmune primaria y secundaria<sup>97</sup>, actuando incluso como reguladores del desarrollo y diferenciación de células del sistema inmune<sup>98</sup>.

En lo que respecta a la inmunidad innata, juegan un papel fundamental en la diferenciación y desarrollo de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Por ejemplo, miR-155 y miR-223<sup>97</sup> actúan a través de la vía TLR4/NFκB para llevar a cabo su acción reguladora<sup>99</sup>, siendo capaces de desencadenar una serie de estímulos que conducen a la producción de diferentes citocinas proinflamatorias. La activación de esta vía también aumenta la expresión de otros micro-ARN, cuya función es la de actuar como inhibidores de la expresión y el acoplamiento de proteínas necesarias para la transmisión de estas señales, es decir, realizan una función de retroalimentación negativa (figura 4).

Figura 4: Sistema de retroalimentación negativa a través de micro-ARN en la vía TLR4/NFκB.



TLR4: receptor tipo *Toll* 4. MYD88: proteína de diferenciación mieloide primaria 88. IRAK 1/2/4: quinasa asociada al receptor de interleucina 1/2/4. TRAF 6: factor asociado al receptor de TNF tipo 6. TAK1: quinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta 1. TAB 1/2: proteínas de unión a TAK1 1/2. IKK: quinasa de inhibición del factor nuclear kappa B. MAPK: protein-quinasas activadas por mitógenos. IκB: proteína inhibidora del factor nuclear kappa B. NFκB: factor nuclear kappa B. Modificado de O'Neill et al<sup>53</sup>.

Se han identificado numerosos micro-ARN que regulan esta vía de respuesta inflamatoria en distintos puntos, de los que se exponen a continuación algunos de los más representativos:

-Inhibición directa de la expresión de los receptores TLR4 en la membrana celular, como realizan diferentes micro-ARN de la familia *let-7*<sup>100,101</sup>.

-Inhibición de la expresión de proteínas implicadas en la vía TLR4/NFKB: IRAK1, IRAK2 y el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) son inhibidos por miR-146a<sup>102,103</sup>. Otras proteínas de esta vía son inhibidas por miR-155, miR-145 y miR-348<sup>96,104-106</sup>.

-Inhibición de factores de transcripción: así actúa, por ejemplo, miR-9 sobre el NFKB1 o miR-155 sobre FOXP3 o C/EBPB<sup>107,108</sup>.

-Inhibición de la expresión de citocinas: se han encontrado dianas específicas para diferentes micro-ARN en múltiples genes que codifican citocinas, muchos de ellos regulados por varios micro-ARN<sup>109</sup>. Algunos ejemplos relevantes son la regulación de IL6 por let-7<sup>110</sup> o de IL10 por miR-106<sup>111</sup>.

-Inhibición de reguladores de señal: se han identificado dos micro-ARN principales que cumplen este papel, miR-21 y miR-155. El primero regula la producción de IL-10<sup>112</sup> y el segundo la de TLR4<sup>113</sup>, por lo que juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Así pues, la acción reguladora de los micro-ARN sobre la activación de la respuesta inflamatoria a través de la vía TLR4/NFKB tiene lugar en casi todos los puntos de la misma, por lo que cualquier pequeña alteración en esta función reguladora podría conllevar un aumento o disminución de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de diferentes enfermedades. Es importante destacar también que los efectos pleiotrópicos de los micro-ARN y los diferentes puntos de control y de retroalimentación de la respuesta inflamatoria hacen difícil esclarecer de forma completa el papel de cada micro-ARN en la inflamación, así como estimar *a priori* el papel de un micro-ARN determinado en una enfermedad específica.



## Alcohol y micro-ARN

El efecto modulador de los micro-ARN sobre prácticamente todos los procesos biológicos los involucra en la lesión causada por el consumo de alcohol. De hecho, recientemente se ha puesto de manifiesto la relación entre el consumo excesivo de alcohol y determinados micro-ARN, fundamentalmente por lo que respecta a los efectos del alcohol en el hígado y en el SNC.

En cuanto al daño hepático inducido por alcohol, la mayoría de los estudios realizados que analizan el papel patogénico que desempeña en el micro-ARN se han llevado a cabo en modelos animales. En este sentido, se ha demostrado un aumento o disminución de la expresión de determinados micro-ARN en un modelo murino de esteatohepatitis alcohólica, lo que podría estar relacionado con el desarrollo de esta enfermedad<sup>114</sup>. Además, el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal al LPS bacteriano que induce el etanol, clave en el desarrollo de hepatopatía alcohólica<sup>52</sup>, parece estar asimismo regulado, entre otros factores, por la acción de miR-212, que se encuentra elevado en la mucosa intestinal de los pacientes alcohólicos<sup>115</sup>. Otro micro-ARN implicado en el desarrollo de hepatopatía alcohólica sería miR-199, cuya disminución inducida por el consumo de alcohol puede jugar un papel relevante en el aumento de estrés oxidativo inducido por el alcohol<sup>116</sup>. Las células de Kupffer, cuya implicación en el daño hepático inducido por el alcohol ha sido comentada previamente en esta “Introducción”, mostraron en un modelo murino un aumento de la expresión de miR-155 tras la exposición *in vitro* e *in vivo* al etanol<sup>54</sup>.

En un estudio reciente, se ha determinado la expresión a nivel hepático en modelos animales de cuatro micro-ARN implicados en la regulación de la vía TLR4/NFκB (miR-155, miR-132, miR-146a y miR-125b), apreciándose un aumento significativo de la expresión de miR-155 y miR-132 tras la exposición al alcohol tanto

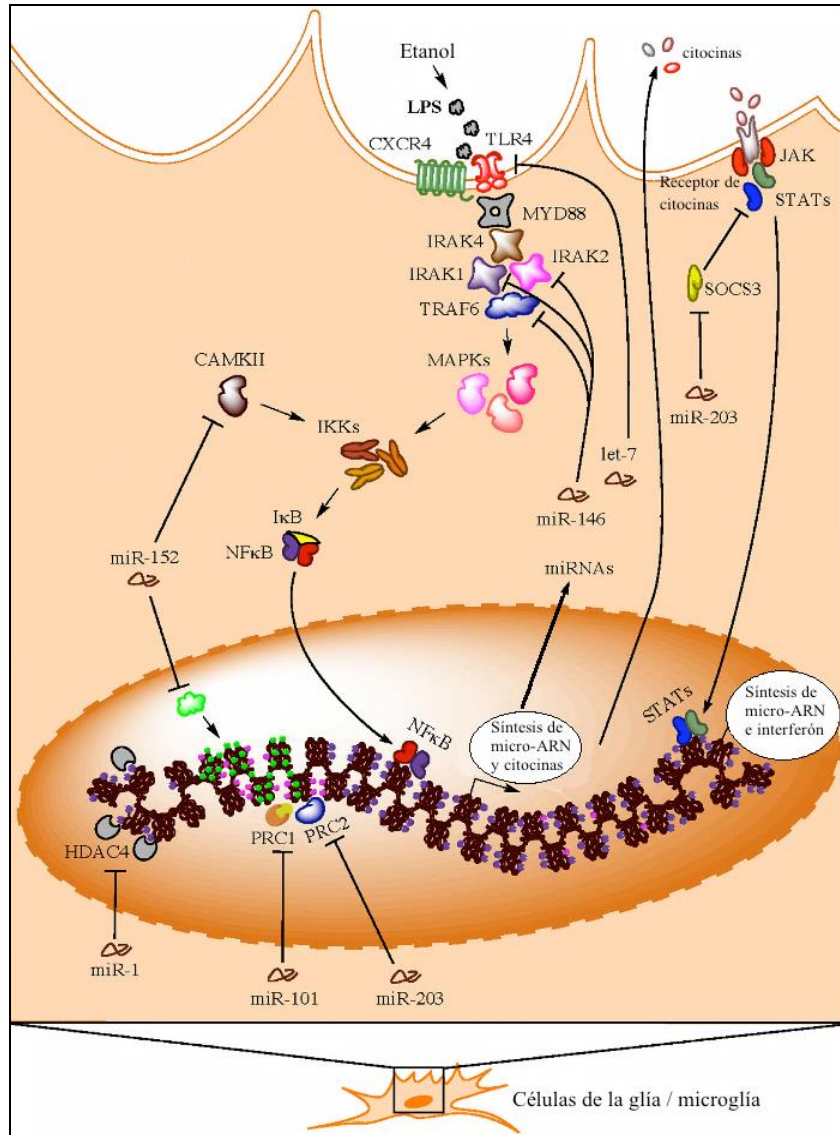
en los hepatocitos como en las células de Kupffer<sup>117</sup>. Esto refuerza el papel de dichos micro-ARN en la inflamación asociada a la hepatopatía alcohólica<sup>118,119</sup>. En resumen, la evidencia científica acumulada hasta el momento parece indicar que diferentes micro-ARN pueden tener un papel fundamental en la inflamación hepática inducida por el consumo de alcohol.

Centrándonos ahora en el efecto del etanol en el SNC, recientemente se han identificado, a través de un *array* de expresión, numerosos micro-ARN cuya expresión se encuentra modificada en el tejido cerebral de pacientes alcohólicos con respecto a sujetos controles<sup>86</sup>. Muchos de ellos regulan la expresión de genes implicados en el funcionamiento cerebral y en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso central<sup>120,121</sup>, y otros, como miR-146a, están también implicados en la respuesta inflamatoria. Otro trabajo reciente, mostró la sobreexpresión en pacientes alcohólicos de un grupo de micro-ARN que regulan la expresión de genes relacionados con el crecimiento, diferenciación y función de células de la glía<sup>87</sup>. Otros estudios apuntan a que determinados micro-ARN, como miR-9, podrían estar involucrados en los fenómenos de neuroadaptación que se producen en el cerebro de los pacientes alcohólicos, y en la capacidad de desarrollar tolerancia a dicha sustancia<sup>122</sup>. Estudios en animales de experimentación han encontrado una relación entre alteraciones en la expresión de micro-ARN y los fenómenos de neuroadaptación y de desarrollo de dependencia del alcohol<sup>78,123</sup>. Tal y como se observa en la figura 5, los micro-ARN actúan como inhibidores de la expresión de múltiples proteínas implicadas en los procesos inflamatorios desencadenados por el alcohol en las células del SNC, e intervienen en todos los niveles de la vía TLR4/NFκB<sup>124</sup>.

A la luz de estos datos, y aunque existe todavía poca información disponible, parece claro que el alcohol induce alteraciones en la expresión de diferentes micro-ARN

en el cerebro, lo que puede tener implicaciones en la fisiopatología de la neurodegeneración y neuroadaptación presente en los pacientes alcohólicos.

Figura 5: Implicación de micro-ARN en los procesos de neuroinflamación inducidos por el consumo de alcohol.



LPS: lipopolisacárido. TLR4: receptor tipo *Toll* 4. CXCR4: receptor de quimiocinas tipo 4. IRAK1/2/4: quinasa asociada al receptor de interleucina 1 tipos 1/2/4. TRAF6: factor asociado al receptor de TNF tipo 6. MyD88: proteína de diferenciación mieloide 88. IKK: quinasa de inhibición del factor nuclear kappa B. MAPK: protein-quinasas activadas por mitógenos. IκB: proteína inhibidora del factor nuclear kappa B. NFκB: factor nuclear kappa B. CAMKII: calcio calmodulina quinasa II. HDAC4: histona deacetilasa tipo 4. PRC1/2: proteína reguladora de citocinesis 1/2. JAK: quinasa Janus. STATs: activadores y transductores de la señal de transcripción. SOCS3: supresor de señal de citocinas tipo 3. Modificado de Nuñez y Mayfield<sup>124</sup>.

## **VULNERABILIDAD GENÉTICA EN EL DESARROLLO DE ALCOHOLISMO Y EHA**

Tanto la EHA como el desarrollo de dependencia al alcohol se enmarcan dentro de las enfermedades poligénicas, en las que la aparición de un determinado fenotipo está provocada por la interacción de diversos factores ambientales con factores genéticos. Aunque escapa del objetivo de este trabajo revisar de forma exhaustiva los múltiples factores ambientales relacionados con la aparición de hepatopatía alcohólica o alcoholismo, sí merece la pena mencionar, en relación con el desarrollo de la EHA, que se cree que existe una relación de tipo dosis-umbral<sup>125</sup> con la cantidad de alcohol consumida, aunque no se ha establecido con claridad una cantidad exacta<sup>126-128</sup> ni una duración mínima del consumo por encima de las que se desarrolle hepatopatía<sup>129</sup>. Otros factores que pueden influir en el desarrollo de EHA son la coexistencia de infección crónica por el virus de la hepatitis C<sup>130</sup>, enfermedades por depósito hepático de hierro<sup>131</sup>, obesidad<sup>132</sup> o mal control glucémico<sup>131</sup>.

Si nos referimos al desarrollo de dependencia alcohólica, parece existir cierta asociación con factores ambientales<sup>133</sup> y también con el patrón de consumo<sup>134,135</sup>. Otros elementos, como la duración del consumo diario de alcohol y la edad de inicio en dicho hábito<sup>136</sup>, así como la cantidad consumida, se asocian a un mayor riesgo de desarrollo de dependencia de alcohol y a una mayor probabilidad de aparición de síndrome de abstinencia<sup>137</sup>.

Además de los factores ambientales citados, existen determinados factores genéticos que se han asociado al desarrollo de trastornos relacionados con el consumo de alcohol. La importancia de los factores genéticos se ha comprobado en estudios realizados en gemelos, que han demostrado la existencia de agregación familiar en el desarrollo de dependencia alcohólica y cirrosis hepática<sup>138-140</sup>. Cabe destacar, asimismo,

que el sexo tiene una influencia sobre la progresión del daño hepático inducido por el alcohol, de forma que las mujeres son más vulnerables al mismo que los hombres, independientemente de su nivel de consumo<sup>141</sup>. Por el contrario, la neuroadaptación y el desarrollo de dependencia alcohólica aparecen con mayor frecuencia en los hombres<sup>142</sup>.

Todos estos hallazgos sugieren la existencia de una predisposición genética para el desarrollo tanto de los trastornos por uso de alcohol (incluyendo la dependencia alcohólica) como de los diferentes trastornos derivados del consumo de alcohol, especialmente la EHA. En este sentido, se han realizado numerosos estudios para tratar de identificar variantes genéticas que condicionen dicha predisposición. Además de los rastreos hologenómicos (*genome wide-scan*), muchos estudios han analizado polimorfismos genéticos concretos, localizados en “genes candidatos”, y su potencial asociación con diferentes patologías asociadas al consumo de alcohol.

Un polimorfismo genético se define como una variante del ADN originada por una mutación, transmitida a la descendencia hasta alcanzar una frecuencia superior al 1% en la población general<sup>143</sup>. Existen diferentes tipos de polimorfismos, pero los más frecuentes son los llamados polimorfismos de un único nucleótido (*SNP, single nucleotide polymorphism*), en los que la diferencia entre la variante mutante y la variante normal consiste en el cambio de un único nucleótido. Estos polimorfismos pueden contribuir tanto a variaciones fisiológicas entre individuos como a la presencia o ausencia de enfermedad, pudiendo considerarse como factores predisponentes al desarrollo de las mismas.

### Estudios genéticos de asociación en la dependencia alcohólica

Se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de hallar variantes genéticas que predispongan al desarrollo de dependencia del alcohol, utilizando tanto genes candidatos como análisis globales del genoma humano (rastros hologenómicos). Las variantes genéticas estudiadas en este campo se han centrado fundamentalmente en enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol y a diferentes neurotransmisores y sus receptores.

En cuanto a las primeras, los resultados más concluyentes son los correspondientes a un polimorfismo en el gen de la enzima ADH 1B (*ADH1B*). La asociación de este polimorfismo con la dependencia del alcohol está más establecida en población asiática<sup>144-146</sup>, si bien estudios recientes también han encontrado dicha relación en población europea<sup>147</sup>. Otro polimorfismo en el gen de la enzima ALDH 2 (*ALDH2*) también se encuentra asociado a la dependencia del alcohol en población asiática<sup>144,145</sup>.

Con respecto a los diferentes circuitos cerebrales implicados en la adicción, se ha encontrado asociaciones entre determinados fenotipos del alcoholismo (fundamentalmente dependencia alcohólica) y numerosas variantes genéticas. Aunque escapa a los objetivos de este trabajo realizar una revisión exhaustiva del tema, cabe citar, por su relevancia, las posibles asociaciones con variantes alélicas en los receptores para dopamina, como el tipo D2<sup>148</sup>, en el sistema GABA<sup>149,150</sup>, en los circuitos serotoninérgicos<sup>151-153</sup> y glutamatérgico<sup>154,155</sup> y en el sistema opioide<sup>156</sup> y cannabinoide<sup>157</sup>. Estas asociaciones están basadas en estudios de “genes candidatos”, es decir, estudios de asociación centrados en polimorfismos de genes relacionados con la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo, muchos de estos trabajos adolecen de los problemas conocidos de los estudios genéticos de asociación (bajo tamaño muestral o

falta de datos funcionales)<sup>158,159</sup>. Además, en muchos casos, una vez agrupados los datos de diferentes estudios mediante meta-análisis, no se encuentran asociaciones significativas entre estos polimorfismos y el desarrollo de enfermedades relacionadas con el consumo excesivo de alcohol, como la dependencia del alcohol o el síndrome de abstinencia<sup>160,161</sup>.

### **Estudios genéticos de asociación en la EHA**

En el caso de la hepatopatía alcohólica, los polimorfismos genéticos estudiados hasta el momento conciernen fundamentalmente a dos grandes grupos: por un lado, los genes que codifican la expresión de diferentes enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol, y por otro lado, los que codifican la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios (p. ej. interleucinas).

Con respecto a las enzimas hepáticas, los polimorfismos más estudiados se encuentran en las regiones que codifican la expresión de ADH<sup>162</sup>, ALDH<sup>163</sup> y CYP2E1<sup>164</sup>, si bien los resultados son contradictorios y la asociación con diferentes tipos de hepatopatía alcohólica no ha sido claramente establecida<sup>165</sup>.

En cuanto a los mediadores de la respuesta inflamatoria, el gen más estudiado es el que codifica el TNF $\alpha$ . Si bien la implicación de esta citocina en pacientes con EHA parece probada<sup>166</sup>, los datos existentes respecto a la asociación de variantes genéticas del TNF $\alpha$  con hepatopatía alcohólica son controvertidos, y un meta-análisis reciente sólo ha mostrado una evidencia débil de asociación entre polimorfismos de este gen y la EHA<sup>167-169</sup>. Resultados contradictorios y no concluyentes son también los obtenidos en estudios de polimorfismos de diferentes interleucinas cuyos niveles están alterados en

pacientes con hepatopatía alcohólica<sup>170</sup>, como, por ejemplo, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 o IL-12<sup>168,171-175</sup>.

De hecho, ninguna variante genética implicada en el metabolismo del etanol o en la respuesta inflamatoria asociada al consumo de alcohol se ha asociado de forma clara con el desarrollo de EHA. Paradójicamente, el único polimorfismo relacionado de forma consistente con un mayor riesgo de desarrollo de hepatopatía alcohólica es el rs738409 del gen *PNPLA3*, implicado en el metabolismo lipídico<sup>176-178</sup>.

En resumen, puede afirmarse que tanto en relación con el alcoholismo como con la hepatopatía alcohólica, y pese a la gran cantidad de recursos invertidos en este campo, los estudios de asociación genética realizados hasta el momento no han conseguido esclarecer de forma completa el componente genético asociado con dichas alteraciones.

### **POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA VÍA DE LOS MICRO-ARN**

Desde el reconocimiento de los micro-ARN como mediadores de la expresión génica, se han estudiado de forma extensa tanto sus funciones y genes diana como los fragmentos de ADN que los codifican, previamente considerados como ADN no funcional<sup>88</sup>. Concretamente, se han identificado regiones de ADN que codifican unos 1200 micro-ARN, cuya función no se conoce por completo en la mayoría de los casos. Asimismo, se han tratado de identificar variantes genéticas en estas regiones que puedan conllevar alteraciones en las funciones reguladoras de los micro-ARN, y con ello favorecer el desarrollo de diferentes patologías<sup>179</sup>. De esta forma se han descrito numerosos SNP en los genes que codifican micro-ARN y varios de ellos se han asociado recientemente con un mayor riesgo de aparición de enfermedades,



fundamentalmente diferentes tipos de cáncer<sup>180</sup>, pero también otras patologías, como diabetes mellitus o artritis reumatoide<sup>181,182</sup>. También es de gran interés el hecho de que se hayan identificado polimorfismos en los puntos de unión de los micro-ARN a sus genes diana, muchos de ellos en regiones 3'UTR que previamente se presumían como no funcionales, siendo de nuevo en el cáncer donde se han realizado más avances<sup>183</sup>. Ambos tipos de polimorfismos, en las regiones que codifican micro-ARN o en las regiones de sus genes diana que coinciden con los puntos de unión, considerados globalmente como polimorfismos en la vía de los micro-ARN, pueden ser de utilidad no solo en la predicción del riesgo de desarrollo y pronóstico de diferentes patologías, sino de interés fisiopatológico para el desarrollo de tratamientos que bloqueen o potencien la acción de determinados micro-ARN<sup>184</sup>.

No existen, hasta la fecha, estudios de asociación genética que hayan analizado la repercusión de polimorfismos genéticos de micro-ARN en pacientes con trastornos relacionados con el consumo de alcohol. Este campo, por lo tanto, no ha sido todavía explorado, y nuestro trabajo constituye, de acuerdo a lo publicado en este momento, la primera aproximación para intentar averiguar la relación entre polimorfismos de micro-ARN y el desarrollo de alcoholismo o hepatopatía alcohólica. Con el objeto de estudiar esta relación, y asumiendo que la información disponible para tomar decisiones es escasa, hemos seleccionado una serie de polimorfismos potencialmente implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria que podrían estar relacionados con la presencia de alcoholismo o hepatopatía alcohólica en base a su funcionalidad biológica y resultados previos en otras enfermedades, y que se revisan a continuación.

**Polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* (rs2910164)**

El micro-ARN miR-146a actúa disminuyendo la expresión de proteínas implicadas en la transmisión de la señal inflamatoria, como IRAK1, IRAK2 o TRAF6<sup>99,103</sup>, dentro de la vía TLR4/NFκB. Dado que actúa inhibiendo la expresión de sus dianas, miR-146a constituye un regulador negativo de la activación dicha vía y, por tanto, un incremento en su expresión se asocia con una menor activación inflamatoria. Tal y como se ha mencionado anteriormente, esta vía TLR4/NFκB se encuentra relacionada con el desarrollo de los fenómenos de neurodegeneración y neuroinflamación observados en diferentes enfermedades, entre ellas en el alcoholismo<sup>79,185</sup> y también en la inflamación a nivel hepático inducida por alcohol<sup>186</sup>. Por ello, parece plausible que alteraciones en la función de miR-146a pudiesen estar relacionadas con una desregulación de la actividad inflamatoria a nivel cerebral y hepático provocada por el consumo de alcohol.

El gen que codifica miR-146a (*MIR146A*) se encuentra en el cromosoma 5 (5q34) y presenta un polimorfismo en la región no codificante (60 C>G, rs2910164) y otro en la región promotora (4706120 A>G, rs57095329). La relación entre polimorfismos de miR-146a y diferentes enfermedades ha sido muy estudiada en los últimos años<sup>187-190</sup>, pero ha sido en el cáncer donde se ha encontrado mayor evidencia de la asociación entre variantes de miR-146a y la aparición de neoplasias<sup>191</sup>. En concreto, es del polimorfismo 60C>G (rs2910164) del que se dispone de más información, y estudios funcionales previos han demostrado una menor acción inhibitoria sobre sus dianas del alelo C en comparación con la del alelo G. Por tanto, la presencia del alelo C del polimorfismo citado parece conllevar un aumento de la actividad inflamatoria a través de la vía TLR4/NFκB<sup>191-193</sup>.

### **Polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* (rs11614913)**

Entre las proteínas reguladas por miR-196a2, se encuentran algunas responsables del desarrollo estructural celular y embrionario, fundamentalmente las que componen el grupo HOX (*homeobox*) y que actúan como factores de transcripción<sup>194</sup>. MiR-196a2 también regula la expresión de proteínas HMGA (*high mobility group A*), relacionadas con el desarrollo estructural del núcleo celular<sup>195</sup>, y la de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la vía TLR4/NFκB, como *TRAF6*<sup>196</sup>.

El gen que codifica miR-196a2 se localiza en el cromosoma 12 (12q13.13), y el polimorfismo rs11624913 se encuentra en la región no codificante (78 C>T). La mayor parte de los estudios previos han relacionado a este micro-ARN, y en concreto al polimorfismo citado, con el desarrollo de neoplasias<sup>197</sup>, encontrándose que la presencia del alelo C se asocia a una mayor producción del micro-ARN maduro y a alteraciones en la capacidad de unión a su diana, hechos que parecen estar claramente relacionados con la aparición de diferentes tipos de tumores<sup>197,198</sup>.

También se ha encontrado una asociación entre este polimorfismo y otras enfermedades con un componente inflamatorio, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>198</sup>, lo que apoya la hipótesis de que este polimorfismo esté implicado también en la regulación de la inflamación.

### **Polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* (rs61764370)**

El gen *KRAS* codifica una proteína de la superfamilia de las GTPasas, cuya función habitual es la de reclutar y activar proteínas necesarias para la propagación de estímulos de crecimiento celular, por lo que mutaciones del mismo podrían conllevar alteraciones graves del desarrollo y diferenciación celular. De hecho, variaciones

genéticas mínimas contribuyen a la expresión de una proteína con mayor grado de actividad, lo que se ha relacionado con en el desarrollo de múltiples neoplasias como adenocarcinoma de pulmón, adenoma mucinoso de ovario, carcinoma ductal de páncreas y carcinoma colorrectal<sup>199,200</sup>. Se ha estudiado previamente el posible papel del alcohol como factor desencadenante de mutaciones en el gen *KRAS*, pero los resultados no han mostrado una asociación significativa<sup>201,202</sup>.

El gen que codifica dicha proteína se sitúa en el cromosoma 12 (12p12.1), y se ha localizado un polimorfismo en la región 3'UTR (3377 T>G). Esta región es el punto de unión de varios micro-ARN, fundamentalmente de la familia let-7, que actúan como reguladores negativos de la expresión de este gen y por tanto pueden considerarse como supresores tumorales<sup>203</sup>. La presencia de la variante mutada de este polimorfismo impide la correcta acción reguladora de los micro-ARN<sup>204</sup>, y se ha asociado al desarrollo de neoplasias, a una mayor gravedad de las mismas y a un peor pronóstico vital. Ha sido estudiado fundamentalmente en el cáncer de ovario y mama<sup>205</sup>, pulmón<sup>206</sup> u oral<sup>207</sup>.

La relación de este polimorfismo con el alcoholismo o los trastornos relacionados con el consumo de alcohol no ha sido estudiada previamente, aunque existen datos que apoyan una posible asociación con este gen. Por un lado, la acción reguladora de la familia de micro-ARN let-7 parece estar implicada en la activación de las células estrelladas que tiene lugar durante el desarrollo de EHA<sup>208</sup>. Por otro lado, una menor actividad de *KRAS* determinó una reducción en el deseo de consumir alcohol en ratones con consumo crónico previo<sup>209</sup>. Además, recientemente se ha identificado una sobreexpresión de varios micro-ARN de la familia let-7 en tejido cerebral de pacientes alcohólicos<sup>86,208</sup>.

### **Polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* (rs1368439)**

La subunidad B de la IL-12 actúa sobre los linfocitos T y las células NK, entre otros efectos sobre el sistema inmune. Su producción tiene lugar en los macrófagos activados y es esencial para la diferenciación de los linfocitos Th1 y la activación de la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares. Se encuentra íntimamente relacionada con la vía TLR4/NFκB, ya que es una de las interleucinas cuya producción es estimulada por NFκB y, además, actúa como regulador de dicha vía.

El papel de IL-12B en el desarrollo de enfermedades ha sido ampliamente estudiado, identificándose varios polimorfismos de dicho gen asociados a una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades, fundamentalmente inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>210</sup>, la esclerosis múltiple<sup>211</sup> o la artritis reumatoide<sup>212</sup>. También se ha encontrado una asociación entre polimorfismos de *IL12B* y desarrollo de tumores, fundamentalmente del área otorrinolaringológica<sup>213</sup>. Estudios previos no han demostrado una asociación entre polimorfismos de *IL12B* y el alcoholismo<sup>174</sup>.

El gen *IL12B* se localiza en el cromosoma 5 (5q31.1-q33.1) y se ha identificado un SNP en la región 3'UTR (2124 G>T, rs1368439), que constituye una diana potencial de miR-23 (TargetScan 6.2)<sup>214,215</sup>. Este micro-ARN, a su vez, regula la acción de IL-12<sup>216</sup>. Su relación con el desarrollo de trastornos relacionados con el alcohol no ha sido previamente estudiada.

### **Polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* (rs1131445)**

La acción de IL-16 tiene lugar a diferentes niveles: ejerce como agente quimiotáctico, modula la activación de los linfocitos T e inhibe la replicación viral

intracelular, entre otros. Además, parte del proceso de señalización de dicha interleucina se lleva a cabo a través de los receptores CD4.

Se ha estudiado su papel modulador en diferentes enfermedades inflamatorias, fundamentalmente patología respiratoria como asma bronquial<sup>217</sup>, valorando incluso su utilidad como agente terapéutico<sup>217</sup>. Se ha descrito su implicación también en la fisiopatología de otras enfermedades, como la artritis reumatoide<sup>218</sup> o el mieloma múltiple<sup>219</sup>. No existen estudios que hayan valorado su papel en el alcoholismo o trastornos relacionados con el consumo de alcohol, aunque parece que pequeñas cantidades del mismo podrían disminuir los niveles de IL-16<sup>220</sup>.

El gen que codifica IL-16 se encuentra en el cromosoma 15 (15q26.3), y el polimorfismo descrito (rs1131445) se localiza en la región 3'UTR del mismo (5000C>T). No se ha observado una modificación significativa en los niveles plasmáticos de IL-16 dependiendo de la presencia de uno u otro alelo<sup>221</sup>, por lo que la relevancia fisiopatológica de este polimorfismo parece residir en que se sitúa en una región que constituye un punto de unión de diferentes micro-ARN<sup>222</sup>. La presencia de una mutación en este SNP podría dificultar esta unión y, por tanto, impedir la correcta acción reguladora de los micro-ARN que tienen como diana *IL16*<sup>223</sup>. Se han realizado estudios de asociación de este polimorfismo con enfermedades como el cáncer de colon<sup>224</sup> o la enfermedad de Graves<sup>225</sup>, pero su papel en el alcoholismo no ha sido estudiado hasta la fecha.

### **Polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* (rs3917328)**

El receptor tipo 1 de interleucina 1 (IL1R1), expresado fundamentalmente en linfocitos T, se encuentra implicado en múltiples procesos de regulación de la respuesta

inmune, y supone uno de los reguladores finales en la vía de transmisión de la señal inflamatoria TLR4/NFκB. Se ha investigado su relación con múltiples enfermedades, y algunos polimorfismos de este gen, fundamentalmente los de la región promotora, se han asociado significativamente con enfermedades infecciosas<sup>226</sup>, inflamatorias<sup>227</sup> o neoplasias<sup>228</sup>. Polimorfismos de este gen también han sido previamente estudiados en pacientes alcohólicos, observándose una asociación con una mayor susceptibilidad al desarrollo de alcoholismo<sup>229</sup>.

El gen *IL1R1* se sitúa en el cromosoma 2 (2q12), y se ha identificado un polimorfismo en la región 3'UTR (3114 C>T, rs3917328). Aunque su relevancia funcional no ha sido estudiada, se sitúa en una región que supone una diana potencial para miR-19 (TargetScan 6.2)<sup>214,215</sup>.

### **Polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* (rs4648143)**

El factor de transcripción NFκB es activado por diversos estímulos, como citocinas, RLO o partículas bacterianas o víricas, y es capaz de modificar la expresión de numerosos genes implicados en diferentes acciones biológicas. Tal y como se ha explicado previamente, su papel en la vía de transmisión de señales iniciada por los receptores TLR4 es fundamental, actuando como inductor de la expresión de múltiples citocinas inflamatorias.

Polimorfismos en dicho gen han sido relacionados con mayor susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades inflamatorias como el lupus<sup>230</sup>, y sobre todo en diferentes tipos de cáncer, como el colorrectal<sup>231</sup> o el pulmonar<sup>232</sup>. Otros estudios han mostrado asociación con un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de hepatopatía alcohólica en pacientes con dependencia al alcohol<sup>233</sup>.

El gen *NFKB1* se sitúa en el cromosoma 4 (4q24), y el polimorfismo descrito se localiza en la región 3'UTR (3400 A>G, rs4648143). Este polimorfismo se localiza en una región que es diana potencial para miR-557 y ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de cuello uterino<sup>234</sup>.



# *OBJETIVOS*

---



A pesar de los numerosos estudios realizados, en la actualidad no se conocen con exactitud las variantes genéticas implicadas en la predisposición para el desarrollo de alcoholismo, entendido como dependencia o abuso de alcohol, o en la aparición de hepatopatía alcohólica.

Por ello, el **objetivo general** del presente trabajo fue estudiar factores genéticos que puedan influir en la susceptibilidad para el desarrollo de alcoholismo o EHA.

Con este propósito se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar en población española la prevalencia de polimorfismos de genes implicados en la regulación de la respuesta inmune a través de la vía de los micro-ARN en un grupo control y en un grupo de pacientes alcohólicos con dependencia o abuso de alcohol según criterios DSM-IV, y con cirrosis alcohólica o sin hepatopatía. Se incluyeron para ello variantes alélicas de genes que codifican micro-ARN y de genes que presentan polimorfismos en puntos potenciales de unión de micro-ARN:

-Polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* (rs2910164)

-Polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* (rs11614913)

-Polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* (rs61764370)

-Polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* (rs1368439)

-Polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* (rs1131445)

-Polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* (rs3917328)

-Polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* (rs4648143)

2. Integrar nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios en los que se haya analizado la relación entre diferentes variantes genéticas y el alcoholismo, la dependencia del alcohol o la hepatopatía alcohólica.

# *PACIENTES Y MÉTODOS*

---



## **MUESTRA OBJETO DE ESTUDIO**

Se incluyeron un total de 457 individuos, todos ellos varones, de los que 301 eran pacientes alcohólicos y 156 controles sanos. Los 301 pacientes habían consumido más de 100 g de etanol al día durante, al menos, diez años, con una media de edad de 52,2 años (desviación estándar [DE] = 14,4). Fueron excluidos los consumidores de otro tipo de sustancias de abuso (a excepción de la nicotina), y también aquellos que presentaban diagnósticos de enfermedades psiquiátricas mayores.

La mayoría de los pacientes fueron reclutados en la Unidad de Alcoholismo del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Salamanca y en la planta de hospitalización del mismo; otros pacientes procedían del Hospital Virgen de la Concha (Zamora) y los restantes del Servicio de Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca.

Se utilizaron los criterios diagnósticos DSM-IV-TR<sup>28</sup>, aplicados de forma sistemática mediante una entrevista semi-estructurada realizada por personal adiestrado en el diagnóstico y tratamiento de los trastornos relacionados con el consumo de alcohol. Del total de pacientes, 189 cumplían criterios de dependencia del alcohol y los restantes 112 de abuso del alcohol.

Entre los pacientes alcohólicos, 103 presentaban cirrosis hepática, y en 93 de ellos se había establecido el diagnóstico mediante biopsia hepática y hallazgos anatomopatológicos compatibles. En los 10 casos restantes, cuya biopsia hepática estaba contraindicada por la presencia de alteraciones de la coagulación, la cirrosis hepática se definió por criterios clínicos (estigmas de hepatopatía crónica, historia de ascitis, encefalopatía hepática o sangrado digestivo por varices esofágicas) y hallazgos sugerentes de cirrosis en la ecografía hepática o de varices gastroesofágicas en la endoscopia digestiva alta.

Los restantes 198 pacientes fueron clasificados como sin EHA, dado que no

presentaban estigmas de hepatopatía crónica (alteraciones cutáneas, hepatoesplenomegalia, ginecomastia o atrofia testicular), las pruebas analíticas no estaban alteradas (excepto elevaciones aisladas de la GGT), y en las pruebas de imagen no se encontraron hallazgos sugestivos de enfermedad hepática. Se excluyeron pacientes alcohólicos que no cumplieran estos criterios y en los que no estuviera indicada la realización de biopsia hepática, dada la imposibilidad de clasificarlos en un grupo concreto de estudio

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y los anticuerpos para el virus de la hepatitis C fueron negativos en los pacientes alcohólicos de uno y otro grupo, y se descartaron mediante las pruebas diagnósticas habituales otras causas de hepatopatía diferentes de alcoholismo en los pacientes con cirrosis.

La media de edad de los individuos controles fue de 46,7 años (DE=19,5), todos ellos consumidores de menos de 10 g de alcohol/día. Ninguno tenía historia personal o familiar de alcoholismo o de consumo de drogas, salvo tabaquismo.

Todos los pacientes y los controles eran de origen caucásico y originarios de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, así como sus ascendientes hasta el segundo grado. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento, siguiendo las regulaciones legales para Estudios Clínicos en España y previa aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.



## SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS

En nuestro caso, el proceso de selección de genes candidatos se restringió a la vía TLR4/NFκB, fundamental para la transmisión del estímulo inflamatorio generado por el alcohol tanto a nivel hepático como cerebral<sup>51,70</sup>. Dentro de esta vía inflamatoria, la selección de genes se realizó de la siguiente forma:

a) Revisión bibliográfica exhaustiva para identificar aquellos genes y polimorfismos en la vía TLR4/NFκB con mayor probabilidad *a priori* de encontrarse asociados con el alcoholismo. Ello se ha realizado tanto a partir de su implicación fisiopatológica, como utilizando el modelo matemático miRanda ([www.microrna.org/microrna/home.do](http://www.microrna.org/microrna/home.do)) que predice la fuerza de la unión de un determinado micro-ARN a su diana a través de la variación de la energía libre de Gibbs y del grado de conservación de las secuencias que codifican ambos<sup>222,235,236</sup>.

b) Identificación de los micro-ARN con sus correspondientes dianas que estén potencialmente implicados en la transmisión del estímulo inflamatorio inducido por el alcohol a través de la vía TLR4/NFκB. Con este objetivo, se han utilizado las siguientes bases de datos:

- miRbase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org))<sup>237</sup> para la identificación de micro-ARN potencialmente relacionados con la vía estudiada.
- TargetScan 6.2 ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org))<sup>214,215</sup>, que permite identificar dianas potenciales de dichos micro-ARN o regiones diana de micro-ARN en los genes que codifican las proteínas de la vía TLR4/NFκB.

De esta forma, se seleccionaron genes que reflejasen la acción reguladora de micro-ARN específicos sobre la vía TLR4/NFκB en diferentes puntos de la misma.

c) Identificación de polimorfismos genéticos en los genes que codifican dichos micro-ARN, o en las regiones diana de los genes cuya expresión regulan. Para este fin, se han utilizado las bases de datos disponibles (SNP database, National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

## **GENOTIPADO DEL ADN**

### **Obtención del ADN**

La sangre de los pacientes y controles se recogió en tubos con EDTA tras punción venosa periférica. Se extrajo ADN genómico de alto peso molecular a partir de células de sangre periférica a través de los siguientes procesos:

#### *Obtención de células mononucleadas*

En sangre periférica, las células nucleadas se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica [centrifugación de la sangre total en 50 mL de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) durante 30 minutos, 1500 revoluciones por minuto (rpm), a 4°C]. Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón *Fornace* (0,25 M Sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH: 7.5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), el cual proporcionó la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos. Se precipitaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón *Fornace* a una concentración estimada de  $5 \times 10^6$  células/mL, tras lo cual se añadió EDTA 0,5 M pH 8 (concentración final 10 mM), un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; SDS (concentración final 1%) para romper las membranas celulares; y proteinasa K (concentración final 50 µg/mL) para degradar las proteínas. La

mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

#### *Purificación del ADN*

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8 (para prevenir que el ADN fuera “atrapado” en la fase intermedia: entre la fase acuosa y la orgánica) y CIAA (cloroformo/alcohol isoamílico 24:1). Posteriormente se sometió a centrifugación. Con este proceso, el ADN permaneció en la fase acuosa y se limpió de otros residuos al realizar la mezcla con CIAA y centrifugar para separar de nuevo las dos fases, una en la que estaba contenido el ADN y otra que contenía los detritos celulares. Tras este paso, se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el ADN que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O estéril.

#### *Cuantificación del ADN*

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN obtenido se calcularon tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro (*GeneQuant, Pharmacia*) mediante la siguiente la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = \text{DO}_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50$$

El cociente  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$  se utilizó para determinar el grado de contaminación proteica, dado que 260 nm es la longitud de onda a la que se absorbe el ADN y 280 nm la longitud a la que se absorben las proteínas. Se consideraron aceptables los valores comprendidos entre 1,6 y 2,0, siendo el óptimo 1,8. Valores inferiores indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una

nueva purificación del ADN. Valores superiores indican un exceso de ARN, que se eliminó tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando de nuevo según el método descrito.

Las muestras de ADN, con una concentración entre 1000 y 1500 µg/mL, se conservaron a -20 °C en tubos *Eppendorf*, con el fin de evitar la degradación progresiva del ADN y su posible contaminación por microorganismos.

### **Análisis genético del ADN obtenido**

La discriminación alélica de los siete polimorfismos analizados se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real. En cada polimorfismo se comprobó la posición de dicha variante alélica con respecto al punto de inicio de la transcripción, y el número de identificación (rs#) en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology*, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Esta técnica permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia que detecta la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al ADN. El incremento de ADN en cada ciclo de amplificación se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Para llevar a cabo la discriminación alélica de los polimorfismos se empleó el sistema *StepOnePlus*<sup>®</sup> con sondas *TaqMan MGB*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*). Estas sondas son oligonucleótidos marcados que hibridan específicamente y constan de:

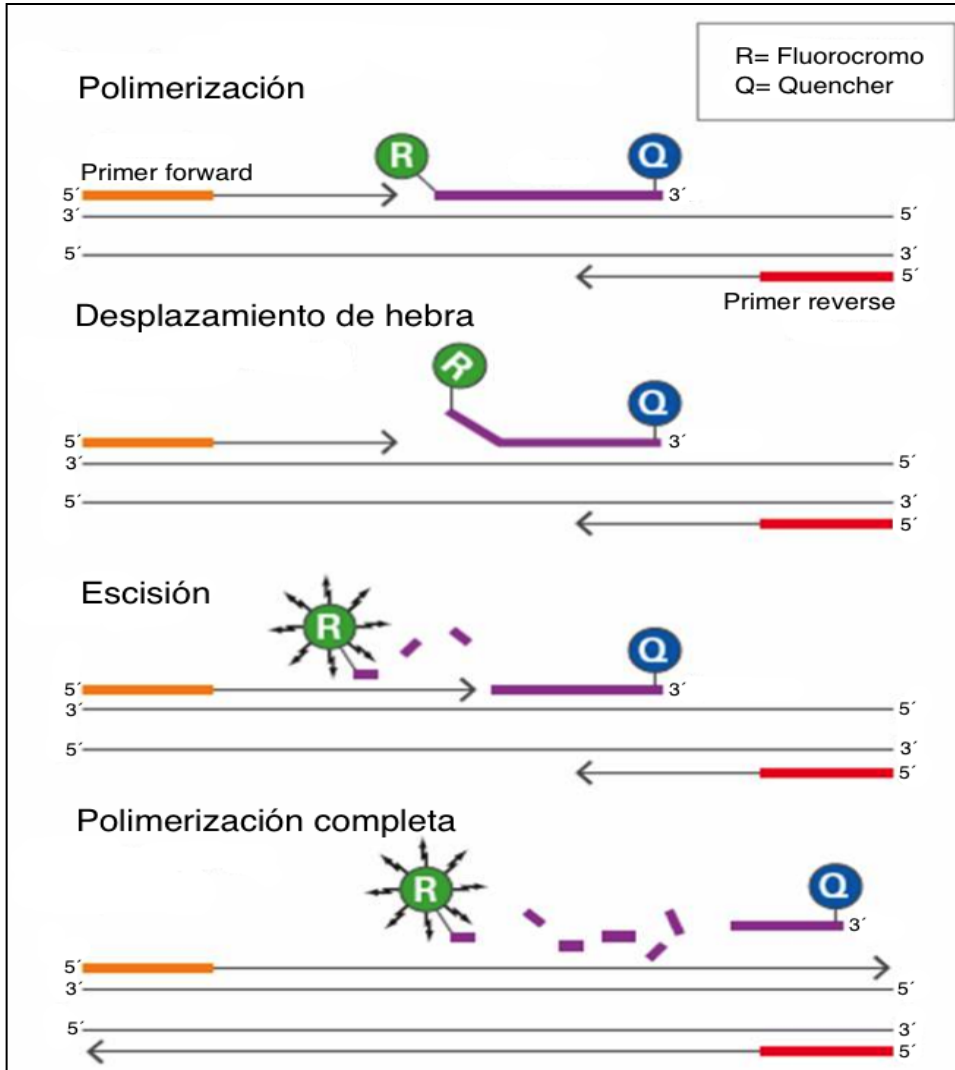
-Un donador (fluorocromo) en el extremo 5', que absorbe energía y pasa al estado excitado, de manera que al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.

-Un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que acepta la energía de la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor. El espectro de emisión del fluorocromo correspondiente se ha de solapar con el espectro de absorción del aceptor. Para que la fluorescencia no sea emitida permanentemente, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas.

Junto al aceptor, se encuentra una modificación MGB (*minor groove binding*) que permite aumentar la temperatura de los ensayos sin tener que ampliar la longitud de la sonda y, a su vez, mejora considerablemente la unión específica de la misma, aumentando la precisión de la discriminación alélica. En los ensayos de discriminación alélica realizados para este estudio, los fluorocromos utilizados para el reconocimiento de cada alelo han sido VIC y FAM (con un espectro de excitación máximo  $\lambda_{abs}$  de 528 nm y 492 nm y un espectro de emisión máximo  $\lambda_{em}$  de 546 nm y 515 nm, respectivamente).

Durante la PCR a tiempo real, mientras la sonda conserve su integridad, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda hibrida con su cadena complementaria de ADN. La enzima ADN-polimerasa, al poseer actividad 5' exonucleasa, cuando se desplaza a lo largo de la cadena en su acción sintética, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor se encuentran en ese momento en una posición alejada el uno del otro de forma irreversible, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 6).

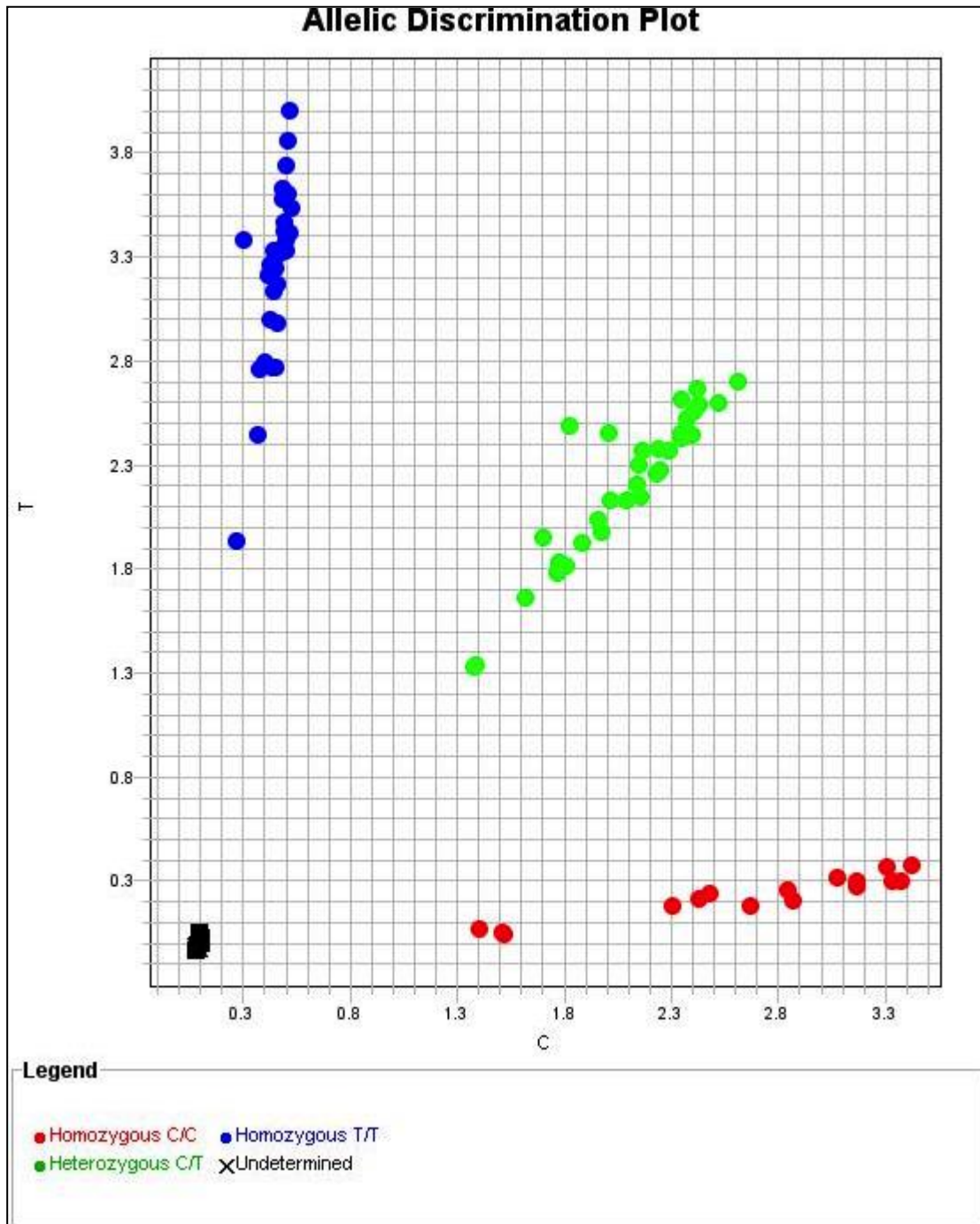
Figura 6: Mecanismo de la PCR con sondas *TaqMan*.



La sonda *TaqMan* complementaria de la secuencia de ADN del alelo correspondiente libera el fluorocromo VIC o FAM al hibridarse con su ADN diana, permitiendo la identificación del alelo presente en la muestra estudiada.

Las gráficas de puntos resultantes permiten la discriminación alélica en cada uno de los pacientes para el polimorfismo estudiado (Figura 7).

Figura 7: Representación gráfica de los resultados del genotipado.



Cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro.

### Condiciones de la PCR para los polimorfismos genéticos analizados

Las condiciones experimentales fueron las mismas para el estudio de los polimorfismos 60 C>G de *MIR146A*, 78 C>T de *MIR196A2*, 2124 G>T de *IL12B*, 5000C>T

de *IL16*, 3114 C>T de *IL1R1* y 3400 A>G de *NFKB1* mediante PCR en tiempo real, a excepción de las sondas utilizadas. Para un volumen total de 10  $\mu$ L se utilizó:

-*TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG*: 5  $\mu$ L.

-Sonda: 0,25  $\mu$ L.

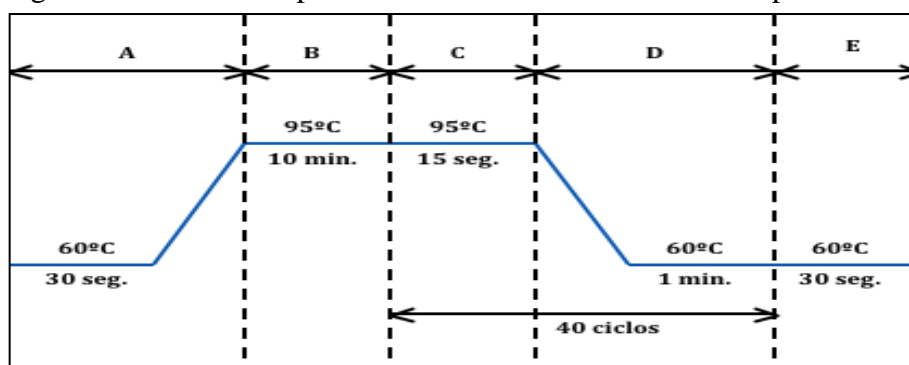
-ddH<sub>2</sub>O: 4,25  $\mu$ L.

-ADN: 0,5  $\mu$ L.

Se utilizaron las siguientes condiciones para la realización de la PCR en tiempo real

(Figura 8).

Figura 8: Condiciones para la realización de la PCR en tiempo real.



Esquema representativo del programa del termociclador para el genotipado de los polimorfismos 60 C>G de *MIR146A*, 78 C>T de *MIR196A2*, 2124 G>T de *IL12B*, 5000C>T de *IL16*, 3114 C>T de *IL1R1* y 3400 A>G de *NFKB1* mediante PCR a tiempo real. A: tramo de pre-PCR; B: desnaturalización inicial; C: desnaturalización; D: anillamiento y elongación; E: elongación final.

Seguidamente, se especifican las características de las sondas utilizadas para la determinación de cada uno de estos polimorfismos, así como el tipo de gráfico de discriminación alélica obtenido.



Polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* (rs2910164)

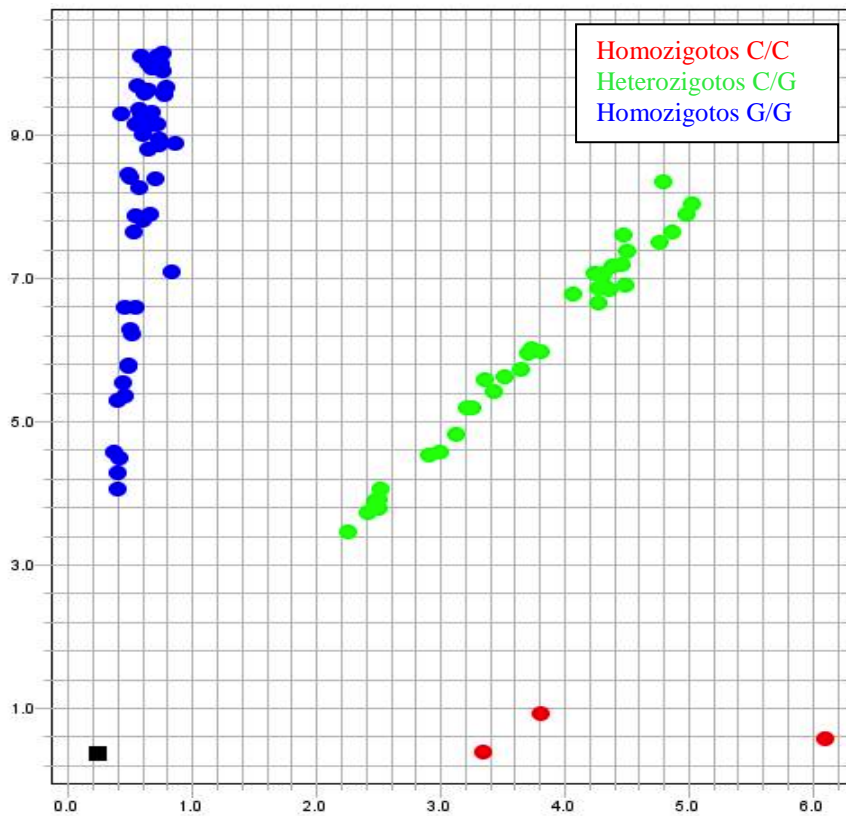
-Sondas empleadas:

VIC: CATGGGTTGTGTCAGTGTGTCAGACCTCTGAAATTCAGTTCTTCAGCTGGGAT

FAM: CATGGGTTGTGTCAGTGTGTCAGACCTGTGAAATTCAGTTCTTCAGCTGGGAT

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 9).

Figura 9: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A*.



*Polimorfismo 78 C>T del gen MIR196A2 (rs11614913)*

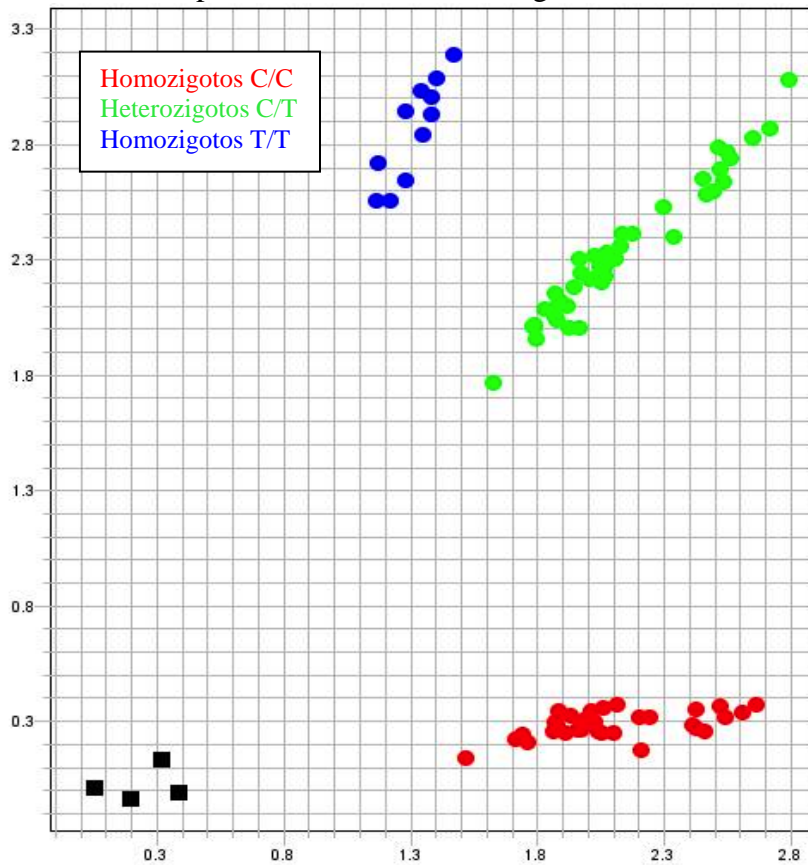
-Sondas empleadas:

VIC: TTTTGA<sup>A</sup>ACTCGGCAACAAGAAACTGCCTGAGTTACATCAGTCGGTTTTTCGT

FAM: TTTTGA<sup>A</sup>ACTCGGCAACAAGAAACTGTCTGAGTTACATCAGTCGGTTTTTCGT

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 10).

Figura 10: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2*.



Polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* (rs1368439)

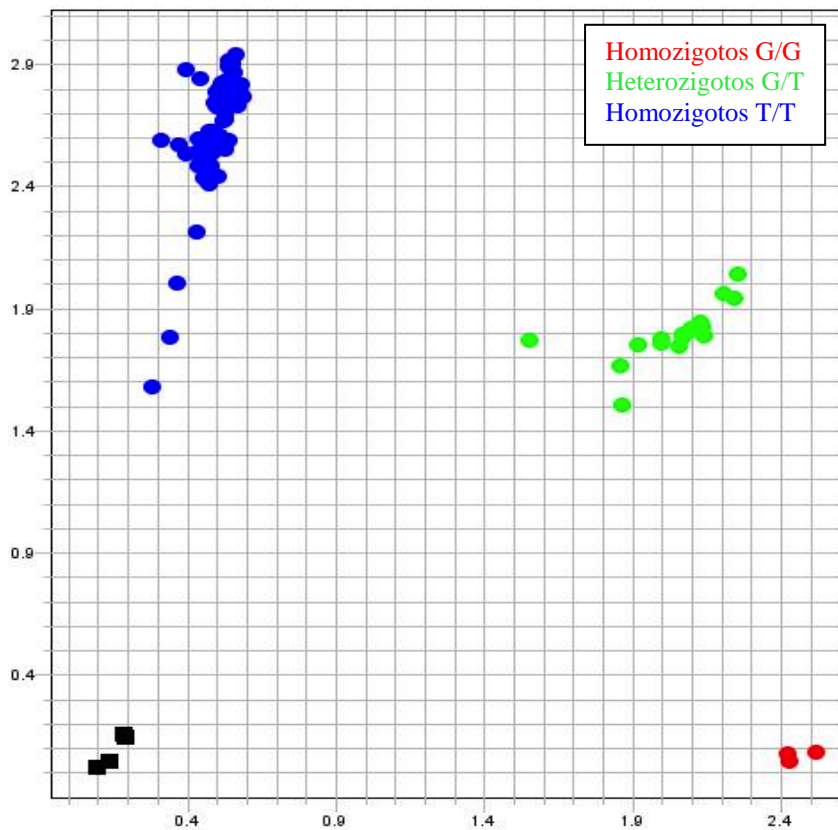
-Sondas empleadas:

VIC: TCTTTGCATCTGTCTGCTTCTCACAGGGCTGTTAAGAAGCCACCTGCCATT

FAM: TCTTTGCATCTGTCTGCTTCTCACATGGCTGTTAAGAAGCCACCTGCCATT

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 11).

Figura 11: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B*.



Polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* (rs1131445)

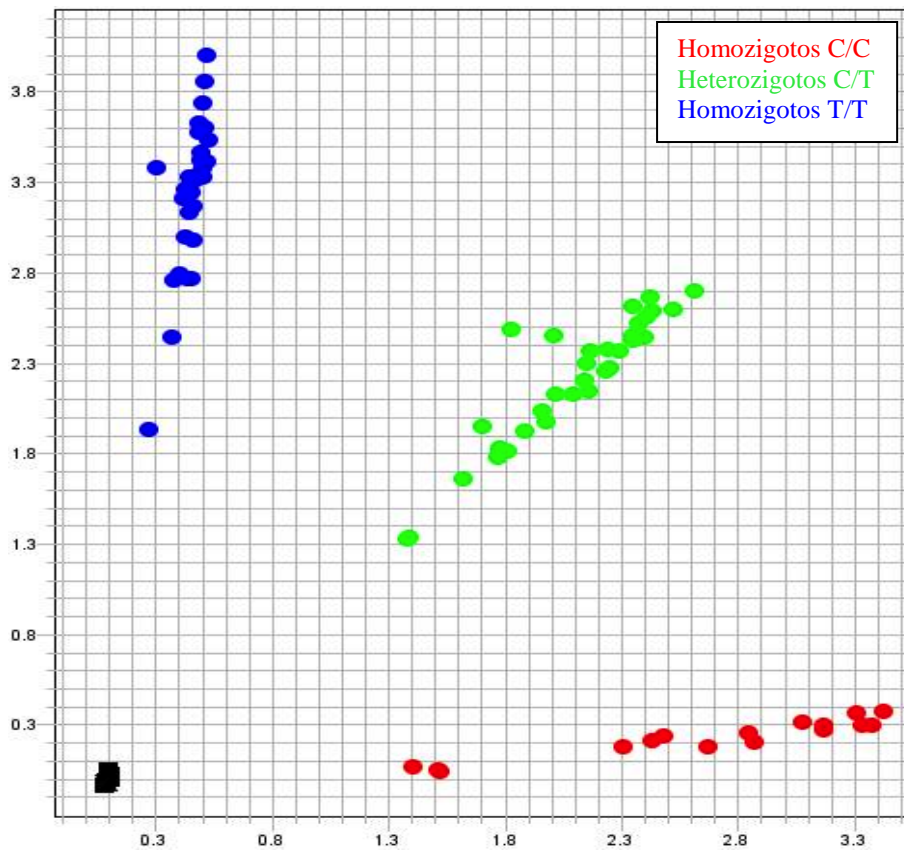
-Sondas empleadas:

VIC: GAGCATCCCAGGATCGCAAGAGCCACCGTAGAAGCTGCATCTTGTTTATACC

FAM: GAGCATCCCAGGATCGCAAGAGCCATTGTAGAAGCTGCATCTTGTTTATACC

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 12).

Figura 12: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 5000C>T del gen *IL16*.



Polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* (rs3917328)

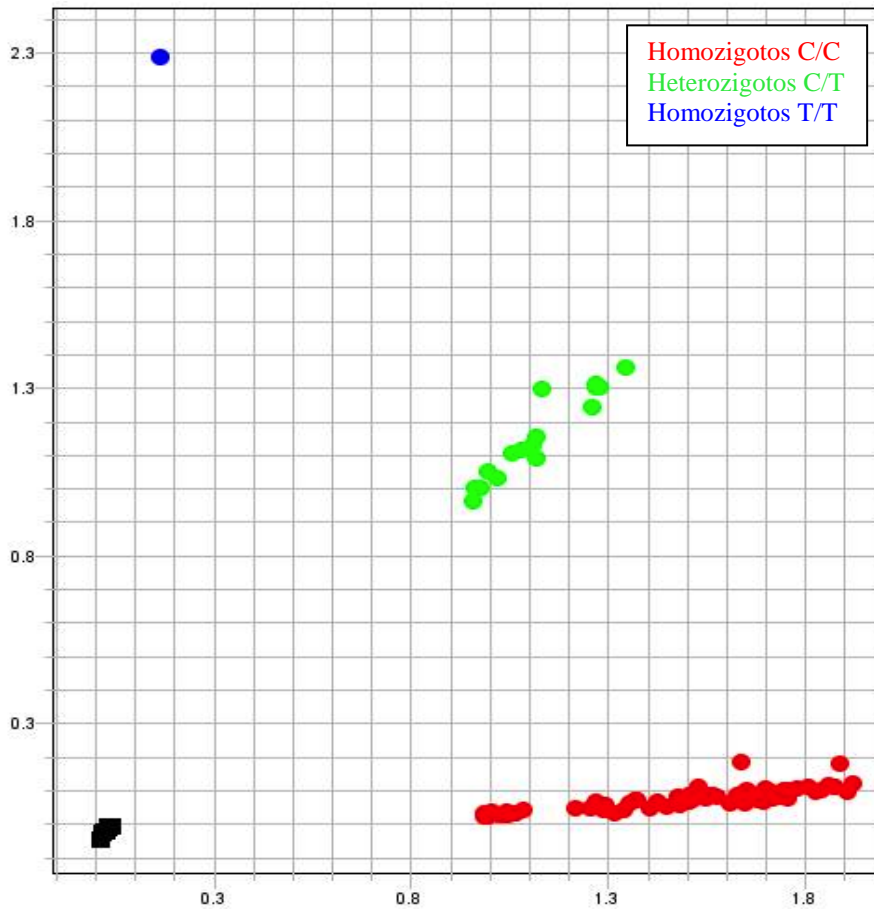
-Sondas empleadas:

VIC: CCCCAGCACTCCTCTGTCTCTGCTCTTGCCTGCACCCTTCCTCCTCCTTT

FAM: CCCCAGCACTCCTCTGTCTCTGCTTTTGCCTGCACCCTTCCTCCTCCTTT

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 13).

Figura 13: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1*.



*Polimorfismo 3400 A>G del gen NFKB1 (rs4648143)*

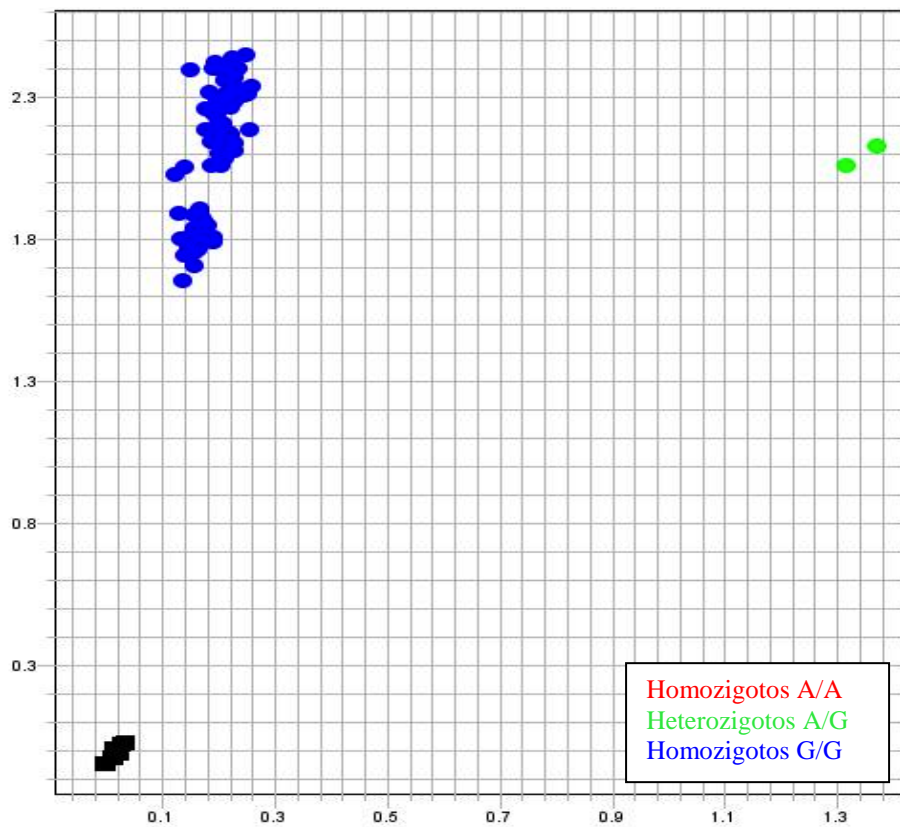
-Sondas empleadas:

VIC: TAGCCTGCTGACAATTTCCCACACCAATGTAAACCAAAGCCCTAAAATTCCA

FAM: TAGCCTGCTGACAATTTCCCACACCAGTGTAAACCAAAGCCCTAAAATTCCA

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 14).

Figura 14: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* obtenido.



Polimorfismo 3377 T>G del gen KRAS (rs61764370)

En el caso del polimorfismo del gen KRAS, se utilizó, para un volumen total de 10  $\mu\text{L}$ :

-TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG: 5  $\mu\text{L}$ .

-Oligo forward: 1  $\mu\text{L}$ .

-Oligo reverse: 1  $\mu\text{L}$ .

-Sonda VIC: 0,04  $\mu\text{L}$ .

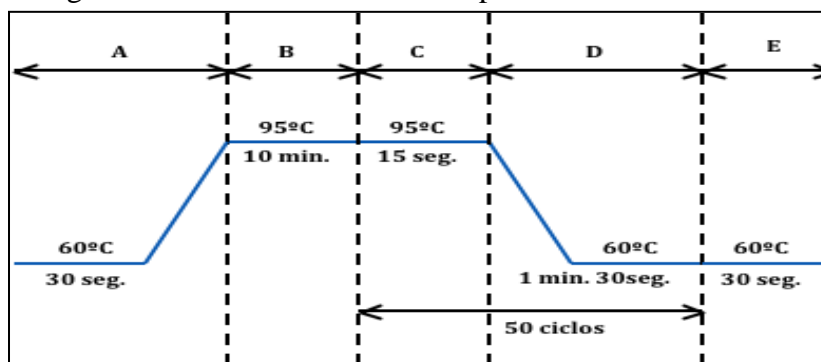
-Sonda FAM: 0,04  $\mu\text{L}$ .

-ddH<sub>2</sub>O: 2,42  $\mu\text{L}$ .

-ADN: 0,5  $\mu\text{L}$ .

Igualmente, se modificaron las condiciones de la PCR en tiempo real para la determinación de este polimorfismo (Figura 15):

Figura 15. Esquema representativo del programa del termociclador para el genotipado del polimorfismo 48361 T>G del gen KRAS mediante PCR a tiempo real.



A: tramo de pre-PCR; B: desnaturalización inicial; C: Desnaturalización; D: anillamiento y elongación; E: elongación final.

-Sondas empleadas:

Oligo forward: GCC AGG CTG GTC TCG AA

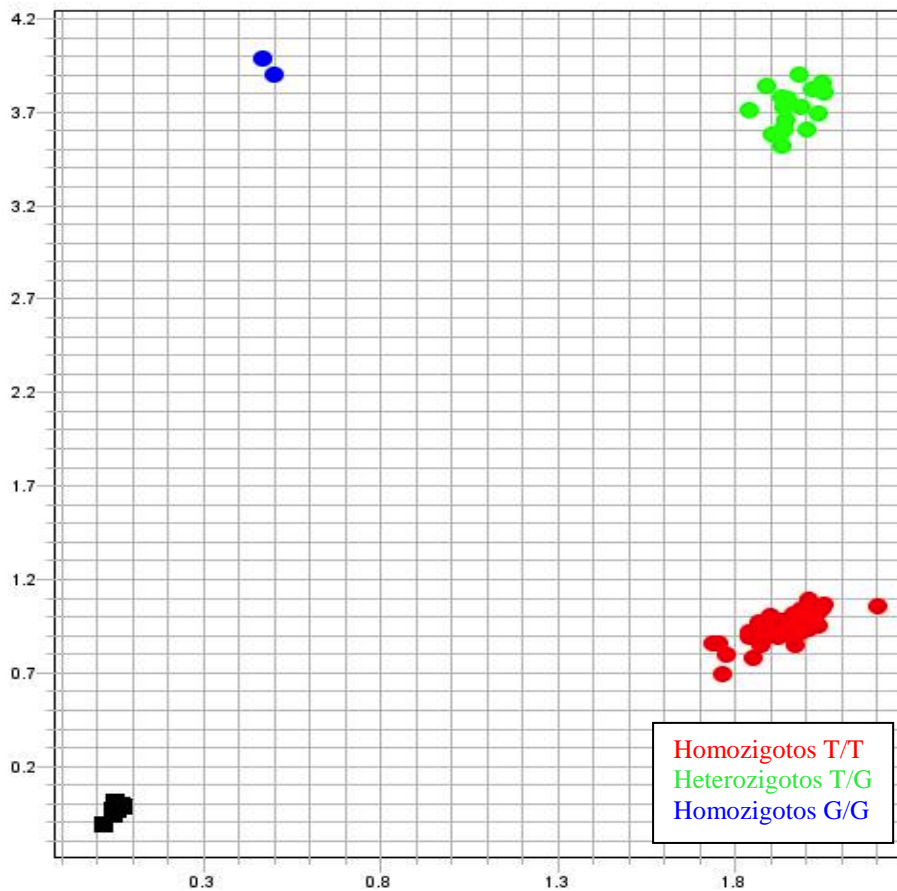
Oligo reverse: CTG AAT AAA TGA GTT CTG CAA AAC AGG TT

VIC: CTC AAG TGA TTC ACC CAC

FAM: CAA GTG ATG CAC CCA C

A continuación, se muestra un ejemplo del tipo de gráfica de discriminación alélica obtenido tras el análisis de este polimorfismo (Figura 16).

Figura 16: Representación gráfica de la discriminación alélica del polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS*.





## **MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

Las variables cuantitativas se presentan como media y DE y para su comparación se utilizó el test de la t de Student. Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y porcentajes y se utilizó el test de  $\chi^2$  para su análisis.

Se calculó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles para cada uno de los polimorfismos estudiados utilizando el test de  $\chi^2$ . La asociación entre cada polimorfismo y la presencia de cada una de las patologías estudiadas se estudió mediante el test de  $\chi^2$ , analizando la distribución de genotipos mediante tablas de 3x2, así como agrupando dichos datos en tablas 2x2 de frecuencia alélica y presencia alélica (comparando los portadores de un alelo frente al resto)<sup>238</sup>. Se utilizó el test exacto de Fisher si las frecuencias esperadas en las tablas 2x2 eran menores de 5. Para todos los polimorfismos se realizó el análisis comparativo de la distribución de las variantes genéticas estudiadas entre los pacientes alcohólicos frente a los controles sanos, pacientes cirróticos frente a alcohólicos sin hepatopatía y alcohólicos dependientes frente a abusadores.

En aquellos polimorfismos que mostraron una asociación significativa con la presencia de enfermedad, se estudió el modelo de herencia que mejor explicaba el riesgo asociado con cada genotipo mediante un análisis de regresión logística multivariante. Los modelos analizados fueron el general, el recesivo y el dominante. En el modelo general, cada genotipo se asocia a un riesgo diferente de padecer la enfermedad. Por ejemplo, en un polimorfismo C>G, cada genotipo posible (CC, CG y GG) se asocia a un riesgo diferente. En el modelo dominante, una única copia del alelo modifica el riesgo de padecer enfermedad (homocigotos CC y heterocigotos CG tendrían el mismo riesgo en un modelo dominante para C). En un modelo recesivo, por contra, son necesarias las dos copias de un alelo para modificar el riesgo (genotipos GG y CG se asociarían a un mismo riesgo,

diferente de CC, en un modelo recesivo para C). En este modelo de regresión logística multivariante se introdujo además la edad como posible variable de confusión.

Utilizando el ejemplo anterior, se identificarían los posibles genotipos como variables (0 = CC, 1 = CG, 2 = GG), creando dos variables indicadoras (*dummy*) (1 y 2) y utilizando la variable 0 como referencia en el modelo general. Para el modelo dominante se agruparían los genotipos CG y CC en una variable única (1), comparándola con la variable 0 de referencia (genotipo GG). Para el modelo recesivo se denominaría como variable 0 de referencia a los genotipos GG + GC y 1 al genotipo CC, comparando el riesgo asociado a ambas.

La comparación entre modelos para elegir el más idóneo se realizó mediante el criterio de información de Akaike ( $AIC = 2 \times n^\circ \text{ de parámetros} - 2 \times \ln \text{ verosimilitud}$ ), cuya fórmula incluye el ajuste del modelo (logaritmo de la verosimilitud) y el principio de parsimonia (número de parámetros), eligiendo el modelo con un menor valor de este criterio<sup>239</sup>. Para cada modelo de herencia se obtuvo la *odds ratio* (OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

Los análisis estadísticos descritos, así como los relativos a la descripción de las características de la muestra (pacientes y controles) se llevaron a cabo con el programa SPSS v20 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Se consideró significativo un valor de  $P < 0,05$ .

Considerando el tamaño muestral de nuestro estudio (301 pacientes alcohólicos y 156 controles sanos) y asumiendo un nivel de significación  $\alpha$  del 5% y una prevalencia del alelo menos frecuente del 20% entre los controles, el presente estudio posee una potencia estadística del 97,1% para la detección de un polimorfismo que confiere una OR = 2,5 para la presencia de alcoholismo y una potencia de 83,6% si consideramos una OR = 2. Este

cálculo se realizó utilizando el programa *PS: Power and Sample Size Calculations* v.3.0.43 *software*, disponible en: <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize><sup>240</sup>.



# *RESULTADOS*

---



Las características detalladas de los individuos de nuestra muestra y el resultado del análisis de cada uno de los polimorfismos se muestran en el anexo I del presente trabajo. La edad media del conjunto de los sujetos incluidos fue de 50,5 (DE = 15,4) años y se encontró una diferencia significativa ( $P = 0,001$ ) al comparar la edad de los pacientes alcohólicos (52,2 años, DE = 12,5) años y los pacientes controles (47,0 años, DE = 19,6) años. Se encontró también una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) al analizar las diferencias entre la media de edad en pacientes alcohólicos cirróticos (59 [11,8] años) y en pacientes alcohólicos sin hepatopatía (48,6 [11,6] años). También se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,019$ ) al comparar la media de edad en pacientes con dependencia (50,9 [10,6] años) y abuso del alcohol (54,5 [14,9] años).

De los 103 pacientes cirróticos incluidos, 43 de ellos (41,7%) cumplían criterios de abuso del alcohol, mientras que 60 (58,3%) presentaban dependencia del alcohol de acuerdo a los criterios DSM-IV-TR. Entre los pacientes alcohólicos sin hepatopatía (198 pacientes), 69 (34,8%) eran abusadores del alcohol y 129 (65,2%) dependientes. Las diferencias entre porcentajes en ambos grupos no fueron estadísticamente significativas.

## ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

### Polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* (rs2910164)

Los resultados obtenidos al analizar el polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* se muestran en las tablas 1-4. Se encontró una diferencia significativa en la distribución genotípica de los pacientes alcohólicos frente a los controles sanos ( $P = 0,049$ ), así como al comparar la presencia alélica del polimorfismo estudiado en ambos grupos ( $P =$

0,015). De esta forma, los genotipos con el alelo C (GC o CC) fueron significativamente más frecuentes en los pacientes alcohólicos.

Tabla 1. Distribución genotípica del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A*.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	GG	GC	CC
Total	457	257 (56,3%)	167 (36,5%)	43 (9,4%)
Alcohólicos <sup>a</sup>	301	157 (52,2%)	121 (40,1%)	23 (7,7%)
Controles <sup>a</sup>	156	100 (64,1%)	46 (29,5%)	10 (6,4%)

<sup>a</sup>Distribución genotípica en alcohólicos frente a controles ( $P = 0,049$ )

Tabla 2. Distribución genotípica del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	GG	GC	CC
Con cirrosis	103	57 (55,3%)	38 (36,9%)	8 (7,8%)
Sin hepatopatía	198	100 (50,5%)	83 (41,9%)	15 (7,6%)
Dependientes	189	101 (53,4%)	74 (39,2%)	14 (7,4%)
Abusadores	112	56 (50%)	47 (42%)	9 (8%)



Tabla 3. Distribución alélica del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	GG + GC	GC + CC	G	C
Total	457	424 (92,8%)	200 (43,8%)	681 (74,5%)	233 (25,5%)
Alcohólicos <sup>a</sup>	301	278 (92,4%)	144 (47,8%)	435 (72,3%)	167 (27,7%)
Controles <sup>a</sup>	156	146 (93,6%)	56 (35,9%)	246 (78,8%)	66 (21,2%)

<sup>a</sup> Presencia del alelo C en alcohólicos frente a controles ( $P = 0,015$ )

Tabla 4. Distribución alélica del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	GG + GC	GC + CC	G	C
Con cirrosis	103	95 (92,2%)	46 (44,7%)	152 (73,8%)	54 (26,2%)
Sin hepatopatía	198	183 (92,4%)	98 (49,5%)	283 (71,5%)	113 (28,5%)
Dependientes	189	175 (92,6%)	88 (46,6%)	276 (73%)	102 (27%)
Abusadores	112	103 (92%)	56 (50%)	159 (71%)	65 (29%)

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución genotípica o las frecuencias alélicas de los pacientes alcohólicos dependientes al compararlos con los abusadores del alcohol, ni de los pacientes cirróticos frente a aquellos sujetos sin hepatopatía.

La distribución de los genotipos en los controles sanos se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 2,101$ ;  $P = 0,147$ ), y fue similar a la comunicada previamente en población española<sup>241</sup>, griega<sup>196</sup> o italiana<sup>242</sup>.

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis de regresión logística realizado para estudiar los diferentes modelos de herencia para el alelo C y tras incluir la edad como un potencial factor de confusión. El modelo dominante fue el que mostró significación estadística ( $P = 0,023$ ) y mejor ajuste aplicando el criterio de información de Akaike (que arrojó un valor de 544,921 para este modelo, frente a 546,665 del modelo general y 550,083 del modelo recesivo). De acuerdo a este modelo dominante, la posesión del alelo C (genotipos GC o CC) frente a la posesión del genotipo GG, está asociada con un mayor riesgo de padecer abuso o dependencia de alcohol, con una OR de 1,615 (IC 95% = 1,067 – 2,442;  $P = 0,023$ ).

Tabla 5. Análisis de regresión logística de los genotipos del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* según los distintos modelos de herencia del alelo C.

			Análisis multivariante		
Modelo	Pacientes alcohólicos	Controles	OR	IC 95%	P
<b>General</b>					
CC	23 (7,7)	10 (6,4)	1	Referencia	
GC	121 (40,1)	46 (29,5)	1,242	0,541 – 2,852	0,609
GG	157 (52,2)	100 (64,1)	0,741	0,334 – 1,645	0,461
<b>Recesivo</b>					
CC	23 (7,7)	10 (6,4)	1	Referencia	
GG + GC	278 (92,3)	146 (93,6)	0,901	0,413 – 1,967	0,794
<b>Dominante</b>					
GG	157 (52,2)	100 (64,1)	1	Referencia	
GC + CC	144 (47,8)	56 (35,9)	1,615	1,067– 2,442	0,023

**Polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* (rs11614913)**

Los resultados del análisis de este polimorfismo se muestran en las tablas 6-9. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución genotípica o alélica en los pacientes alcohólicos comparados con los controles sanos ni tampoco entre los diferentes subgrupos de pacientes estudiados.

Tabla 6. Distribución genotípica del polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2*.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	457	175 (38,3%)	217 (47,5%)	65 (14,2%)
<i>Alcohólicos</i>	301	117 (38,9%)	136 (45,2%)	48 (15,9%)
<i>Controles</i>	156	58 (37,2%)	81 (51,9%)	17 (10,9%)

Tabla 7. Distribución genotípica del polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	44 (42,7%)	40 (38,8%)	19 (18,5%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	73 (36,9%)	96 (48,5%)	29 (14,6%)
<i>Dependientes</i>	189	77 (40,7%)	87 (46,1%)	25 (13,2%)
<i>Abusadores</i>	112	40 (35,7%)	49 (43,8%)	23 (20,5%)

Tabla 8. Distribución alélica del polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2*.

Grupo	Individuos	Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
		CC + CT	CT + TT	C	T
Total	457	392 (85,8%)	282 (61,7%)	567 (62%)	347 (38%)
Alcohólicos	301	253 (84,1%)	184 (61,1%)	370 (61,5%)	232 (38,5%)
Controles	156	139 (89,1%)	98 (62,8%)	197 (63,1%)	115 (36,9%)

Tabla 9. Distribución alélica del polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* en los pacientes alcohólicos estudiados.

Grupo	Individuos	Presencia alélica		Frecuencia alélica	
		CC + CT	CT + TT	C	T
Con cirrosis	103	84 (81,6%)	59 (57,3%)	128 (62,1%)	78 (37,9%)
Sin hepatopatía	198	169 (85,4%)	125 (63,1%)	242 (61,1%)	154 (38,9%)
Dependientes	189	164 (86,8%)	112 (59,3%)	241 (63,8%)	137 (36,2%)
Abusadores	112	89 (79,5%)	72 (64,3%)	129 (57,6%)	95 (42,4%)

La distribución de los genotipos en los controles sanos no se desviaba del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 2,081$ ;  $P = 0,149$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron muy similares a las descritas previamente en población caucásica centroeuropea<sup>243,244</sup>.

### Polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* (rs61764370)

Las tablas 10 y 11 muestran el análisis comparativo de las frecuencias genotípicas en los grupos estudiados. Se observa una diferente distribución al comparar

los pacientes alcohólicos con y sin hepatopatía, siendo más frecuente el alelo G en los segundos, aunque dicha diferencia no alcanzó la significación estadística ( $P = 0,063$ ).

Tabla 10. Distribución genotípica del polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS*.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>TT</i>	<i>GT</i>	<i>GG</i>
<i>Total</i>	454	342 (75,3%)	106 (23,3%)	6 (1,3%)
<i>Alcohólicos</i>	299	232 (77,6%)	63 (21,1%)	4 (1,3%)
<i>Controles</i>	155	110 (71%)	43 (27,7%)	2 (1,3%)

En dos de los casos y uno de los controles no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 11. Distribución genotípica del polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>TT</i>	<i>GT</i>	<i>GG</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	84 (81,6%)	16 (15,5%)	3 (2,9%)
<i>Sin hepatopatía</i>	196	148 (75,5%)	47 (24%)	1 (0,5%)
<i>Dependientes</i>	188	144 (76,6%)	42 (22,3%)	2 (1,1%)
<i>Abusadores</i>	111	88 (79,3%)	21 (18,9%)	2 (1,8%)

En dos pacientes sin hepatopatía (uno dependiente y otro abusador), no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

La comparación de las frecuencias alélicas de los grupos estudiados se muestran en las tablas 12 y 13. No se observaron diferencias significativas al comparar casos y controles ni al comparar los subgrupos de pacientes analizados.

Tabla 12. Distribución alélica del polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	<i>TT + GT</i>	<i>GT + GG</i>	<i>T</i>	<i>G</i>
<i>Total</i>	454	448 (98,7%)	112 (24,7%)	790 (87%)	118 (13%)
<i>Alcohólicos</i>	299	295 (98,7%)	67 (22,4%)	527 (88,1%)	71 (11,9%)
<i>Controles</i>	155	153 98,7(%)	45 (29%)	263 (84,8%)	47 (15,2%)

En dos de los casos y uno de los controles no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 13. Distribución alélica del polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	<i>TT + GT</i>	<i>GT + GG</i>	<i>T</i>	<i>G</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	100 (97,1%)	19 (18,4%)	184 (89,3%)	22 (10,7%)
<i>Sin hepatopatía</i>	196	195 (99,5%)	48 (24,5%)	343 (87,5%)	49 (12,5%)
<i>Dependientes</i>	188	186 (98,9%)	44 (23,4%)	330 (87,8%)	46 (12,2%)
<i>Abusadores</i>	111	109 (98,2%)	23 (20,7%)	197 (88,7%)	25 (11,3%)

En dos pacientes sin hepatopatía (uno dependiente y otro abusador), no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

La distribución genotípica en los controles sanos cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,952$ ;  $P = 0,329$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron similares a las descritas en población noruega<sup>245</sup>, italiana<sup>246</sup> y española<sup>247</sup>.

**Polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* (rs1368439)**

Las frecuencias genotípicas obtenidas al analizar este polimorfismo se muestran en las tablas 14 y 15. No se observaron diferencias significativas al comparar pacientes alcohólicos frente a controles ni tampoco al comparar los diferentes subgrupos de pacientes estudiados. La frecuencia de heterocigotos y homocigotos GG fue menor en los pacientes con cirrosis que en sujetos sin afectación hepática, si bien esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

Tabla 14. Distribución genotípica del polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B*.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>TT</i>	<i>GT</i>	<i>GG</i>
<i>Total</i>	453	317 (70%)	125 (27,6%)	11 (2,4%)
<i>Alcohólicos</i>	300	207 (69%)	86 (28,7%)	7 (2,3%)
<i>Controles</i>	153	110 (71,9%)	39 (25,5%)	4 (2,6%)

En 4 individuos (1 paciente y 3 controles) no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 15. Distribución genotípica del polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>TT</i>	<i>GT</i>	<i>GG</i>
<i>Con cirrosis</i>	102	76 (74,5%)	24 (23,5%)	2 (2%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	131 (66,2%)	62 (31,3%)	5 (2,5%)
<i>Dependientes</i>	188	131 (69,7%)	53 (28,2%)	4 (2,1%)
<i>Abusadores</i>	112	76 (67,9%)	33 (29,5%)	3 (2,7%)

En uno de los pacientes alcohólicos (cirrótico y dependiente) no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas se muestra en las tablas 16 y 17. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque cabe destacar la menor frecuencia del alelo G en los pacientes cirróticos.

Tabla 16. Distribución alélica del polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	<i>TT + GT</i>	<i>GT + GG</i>	<i>T</i>	<i>G</i>
<i>Total</i>	453	442 (97,6%)	136 (30%)	759 (83,8%)	147 (16,2%)
<i>Alcohólicos</i>	300	293 (97,7%)	93 (31%)	500 (83,3%)	100 (16,7%)
<i>Controles</i>	153	149 (97,4%)	43 (28,1%)	259 (84,6%)	47 (15,4%)

En 4 individuos (1 paciente y 3 controles) no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 17. Distribución alélica del polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	<i>TT + GT</i>	<i>GT + GG</i>	<i>T</i>	<i>G</i>
<i>Con cirrosis</i>	102	100 (98%)	26 (25,5%)	176 (86,3%)	28 (13,7%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	193 (97,5%)	67 (33,8%)	324 (81,8%)	72 (18,2%)
<i>Dependientes</i>	188	184 (97,9%)	57 (30,3%)	315 (83,8%)	61 (16,2%)
<i>Abusadores</i>	112	109 (97,3%)	36 (32,1%)	185 (82,6%)	39 (17,4%)

En uno de los pacientes alcohólicos (cirrótico y dependiente) no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.



La distribución de los genotipos en los controles sanos cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,058$ ;  $P = 0,808$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron similares a las descritas en población estadounidense<sup>248</sup>.

### Polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* (rs1131445)

Las tablas 18 y 19 muestran el análisis de las frecuencias de los diferentes genotipos obtenidas. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar pacientes y controles o los diferentes subgrupos de pacientes.

Tabla 18. Distribución genotípica del polimorfismo 5000C>T del gen *IL16*.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>
<i>Total</i>	457	171 (37,4%)	211 (46,2%)	75 (16,4%)
<i>Alcohólicos</i>	301	109 (36,2%)	146 (48,5%)	46 (15,3%)
<i>Controles</i>	156	62 (39,7%)	65 (41,7%)	29 (18,6%)

Tabla 19. Distribución genotípica del polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	40 (38,8%)	51 (49,5%)	12 (11,7%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	69 (34,8%)	95 (48%)	34 (17,2%)
<i>Dependientes</i>	189	68 (36%)	93 (49,2%)	28 (14,8%)
<i>Abusadores</i>	112	41 (36,6%)	53 (47,3%)	18 (16,1%)

A continuación (tablas 20 y 21) se muestra la distribución de frecuencias alélicas obtenida al analizar este polimorfismo. No se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos estudiados.

Tabla 20. Distribución alélica del polimorfismo 5000C>T del gen *IL16*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	<i>TT + CT</i>	<i>CT + CC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
<i>Total</i>	457	382 (83,6%)	286 (62,6%)	553 (60,5%)	361 (39,5%)
<i>Alcohólicos</i>	301	255 (84,7%)	192 (63,8%)	364 (60,5%)	238 (39,5%)
<i>Controles</i>	156	127 (81,4%)	94 (60,3%)	189 (60,6%)	123 (39,4%)

Tabla 21. Distribución alélica del polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	<i>TT + CT</i>	<i>CT + CC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	91 (88,3%)	63 (61,2%)	131 (63,6%)	75 (36,4%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	164 (82,8%)	129 (65,2%)	233 (58,8%)	163 (41,2%)
<i>Dependientes</i>	189	161 (85,2%)	121 (64%)	229 (60,6%)	149 (39,4%)
<i>Abusadores</i>	112	94 (83,9%)	71 (63,4%)	135 (60,3%)	89 (39,7%)

La distribución de los genotipos en los controles sanos no se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 2,541$ ;  $P = 0,110$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron similares a las descritas en población originaria de China<sup>221</sup>, aunque en

población iraní se comunicaron frecuencias diferentes, con una menor prevalencia del alelo C (28,8%) y menor porcentaje del genotipo CC (8,6%)<sup>224</sup>.

### Polimorfismo 3114 C>T del gen *ILIR1* (rs3917328)

El análisis comparativo de las frecuencias genotípicas de los diferentes grupos estudiados se muestra en las tablas 22 y 23. No se encontraron diferencias significativas al comparar dichos grupos.

Tabla 22. Distribución genotípica del polimorfismo 3114 C>T del gen *ILIR1*.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	CC	CT	TT
<i>Total</i>	456	389 (85,3%)	65 (14,3%)	2 (0,4%)
<i>Alcohólicos</i>	301	264 (87,7%)	35 (11,6%)	2 (0,7%)
<i>Controles</i>	155	125 (80,6%)	30 (19,4%)	0

En uno de los controles no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 23. Distribución genotípica del polimorfismo 3114 C>T del gen *ILIR1* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Frecuencias genotípicas		
Grupo	Individuos	CC	CT	TT
<i>Con cirrosis</i>	103	88 (85,4%)	15 (14,6%)	0
<i>Sin hepatopatía</i>	198	176 (88,9%)	20 (10,1%)	2 (1%)
<i>Dependientes</i>	189	165 (87,3%)	23 (12,2%)	1 (0,5%)
<i>Abusadores</i>	112	99 (88,4%)	12 (10,7%)	1 (0,9%)

## Resultados

Las diferencias en cuanto a la distribución alélica se muestran en las tablas 24 y 25. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución alélica en los pacientes alcohólicos frente a los controles sanos ( $P = 0,042$ ), debido a una mayor frecuencia del alelo T en los controles sanos que en los pacientes alcohólicos.

Tabla 24. Distribución alélica del polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	CC + CT	CT + TT	C	T
Total	456	454 (99,6%)	67 (14,7%)	843 (92,4%)	69 (7,6%)
Alcohólicos	301	299 (99,3%)	37 (12,3%)	563 (93,5%)	39 (6,5%)
Controles	155	155 (100%)	30 (19,4%)	280 (90,3%)	30 (9,7%)

En uno de los controles no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 25. Distribución alélica del polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	CC + CT	CT + TT	C	T
Con cirrosis	103	103 (100%)	15 (14,6%)	191 (92,7%)	15 (7,3%)
Sin hepatopatía	198	196 (99%)	22 (11,1%)	372 (93,9%)	24 (6,1%)
Dependientes	189	188 (99,5%)	24 (12,7%)	353 (93,4%)	25 (6,6%)
Abusadores	112	111 (99,1%)	13 (11,6%)	210 (93,7%)	14 (6,3%)

La distribución de los genotipos en los controles sanos se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 1,779$ ;  $P = 0,182$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron idénticas a las descritas en población estadounidense<sup>249</sup>.

El análisis multivariante de regresión logística no mostró diferencias significativas al analizar los diferentes modelos de herencia para el alelo T al comparar pacientes alcohólicos y controles sanos ajustando por la edad (Tabla 26). Tampoco mostró significación estadística la introducción de una variable de interacción entre el genotipo y la edad ni hubo diferencias significativas en la edad de los pacientes o controles agrupados por genotipos.

Tabla 26. Análisis de regresión logística de los genotipos del polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* según los distintos modelos de herencia del alelo T.

			<b>Análisis multivariante</b>		
<b>Modelo</b>	<b>Pacientes alcohólicos</b>	<b>Controles</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>General</b>					
CC	264 (87,7%)	125 (80,6%)	1	Referencia	
CT	35 (11,6%)	30 (19,4%)	0,624	0,358 - 1,087	0,096
TT	2 (0,7%)	0 (0%)	NC	NC	0,999
<b>Dominante</b>					
CC	264 (87,7%)	125 (80,6%)	1	Referencia	
CT + TT	37 (12,3%)	30 (19,4%)	0,656	0,379 - 1,137	0,133

NC: no pudo calcularse debido a la ausencia del genotipo TT en controles.

El modelo recesivo no se calculó debido a la ausencia del genotipo TT en controles.

**Polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* (rs4648143)**

Las tablas 27 y 28 muestran el análisis comparativo de las frecuencias genotípicas de este polimorfismo en los diferentes grupos estudiados. No se encontraron diferencias significativas en la comparación de los diferentes grupos de estudio.

Tabla 27. Distribución genotípica del polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1*.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>
<i>Total</i>	456	451 (98,9%)	5 (1,1%)	0 (0%)
<i>Alcohólicos</i>	301	299 (99,3%)	2 (0,7%)	0 (0%)
<i>Controles</i>	155	152 (98,1%)	3 (1,9%)	0 (0%)

En uno de los controles no fue posible determinar genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 28. Distribución genotípica del polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		<b>Frecuencias genotípicas</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Individuos</b>	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>
<i>Con cirrosis</i>	103	102 (99%)	1 (1%)	0 (0%)
<i>Sin hepatopatía</i>	198	197 (99,5%)	1 (0,5%)	0 (0%)
<i>Dependientes</i>	189	187 (98,9%)	2 (1,1%)	0 (0%)
<i>Abusadores</i>	112	112 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas se muestra en las tablas 29 y 30. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados.

Tabla 29. Distribución alélica del polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1*.

		Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
Grupo	Individuos	GG + GA	GA + AA	G	A
Total	456	456 (100%)	5 (1,1%)	907 (99,5%)	5 (0,5%)
Alcohólicos	301	301 (100%)	2 (0,7%)	600 (99,7%)	2 (0,3%)
Controles	155	155 (100%)	3 (2,9%)	307 (99%)	3 (1%)

En uno de los controles no fue posible determinar el genotipo tras realizar dos experimentos.

Tabla 30. Distribución alélica del polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* en los pacientes alcohólicos estudiados.

		Presencia alélica		Frecuencia alélica	
Grupo	Individuos	GG + GA	GA + AA	G	A
Con cirrosis	103	103 (100%)	1 (1%)	205 (99,5%)	1 (0,5%)
Sin hepatopatía	198	198 (100%)	1 (0,5%)	395 (99,7%)	1 (0,3%)
Dependientes	189	189 (100%)	2 (1,1%)	376 (99,5%)	2 (0,5%)
Abusadores	112	112 (100%)	0 (0%)	224 (%)	0 (0%)

La distribución de los genotipos en los controles sanos cumplió el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,014$ ;  $P = 0,903$ ). Las frecuencias de los diferentes genotipos fueron idénticas a las descritas en HapMap para población europea ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=4648143](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4648143)).





# *DISCUSIÓN*

---



Los estudios de asociación genética, como el presente, poseen unas características concretas que afectan a la validez de los mismos y a la interpretación de los resultados, incluyendo ciertas particularidades del análisis estadístico<sup>250</sup>. Por ello, parece adecuado considerar estos aspectos comunes antes de profundizar en la discusión de los resultados concretos de cada uno de los polimorfismos analizados.

## **VALIDEZ DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA**

Con frecuencia, se observan resultados contradictorios para una misma asociación polimorfismo-enfermedad en este tipo de estudios. En muchos casos, la falta de reproducibilidad de una asociación se debe a problemas en la validez interna de los estudios genéticos de casos y controles<sup>251-253</sup>, debido a que existen diversos sesgos y dificultades metodológicas que pueden afectar a la validez de estos trabajos. Ello puede provocar, entre otros efectos, que el grupo de casos y el grupo de controles sean diferentes en sus características basales o en los factores de exposición a una enfermedad. La existencia de estos sesgos puede determinar la falta de detección de una asociación real (falsos negativos) o el hallazgo de relaciones espurias (falsos positivos). A continuación, se detallan algunos de los problemas metodológicos más frecuentes en los estudios de asociación genética de casos y controles.

### **Presencia de factores de confusión**

Este sesgo aparece cuando una determinada variable o factor de confusión se encuentra relacionado de forma simultánea e independiente tanto con la enfermedad estudiada como con el factor de riesgo analizado<sup>254</sup>. En el presente estudio se han controlado diversos factores que podrían influir en el desarrollo de EHA, como el sexo,

la cantidad de alcohol consumido o la presencia de hepatopatía vírica crónica, y otros que podrían influir en el desarrollo de dependencia alcohólica, como la adicción a otras sustancias o la existencia de comorbilidad psiquiátrica grave<sup>255,256</sup>. Una variable no recogida en nuestro trabajo, capaz de actuar como factor de confusión, es la obesidad, cuya presencia puede favorecer el desarrollo de lesión hepática<sup>257</sup>. Otro factor a tener en cuenta es la edad, ya que el riesgo de haber desarrollado EHA o dependencia del alcohol aumenta con el tiempo<sup>258,259</sup>. Dada la diferencia significativa entre la edad media de los grupos estudiados en nuestro trabajo, hemos controlado este factor al realizar el análisis estadístico.

### **Estratificación poblacional**

Este sesgo ocurre cuando la población estudiada está compuesta por dos o más subpoblaciones con diferente frecuencia alélica del polimorfismo analizado y diferente riesgo para el desarrollo de la enfermedad debido a la influencia de otros genes o a factores ambientales<sup>250,253</sup>. Ello ocurre, por ejemplo, cuando se analiza una población compuesta por dos grupos étnicos diferentes.

En el presente trabajo se ha controlado dicho sesgo, ya que todos los casos y controles incluidos, hasta sus ascendientes en segundo grado, proceden de la misma región de España y eran de raza caucásica. Además, el equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplía para todos los polimorfismos, lo que demuestra que se mantuvieron las condiciones de este principio en nuestra población (ausencia de migración, mutación o selección genética y apareamiento aleatorio, entre otras)<sup>254</sup>. En todo caso, la aparición de este sesgo puede darse incluso en poblaciones aisladas, por lo que resulta imposible garantizar por completo su ausencia<sup>253</sup>.

### **Clasificación de casos y controles**

La correcta clasificación de los sujetos incluidos, etiquetando como casos a aquellos que realmente tienen la enfermedad y como controles a aquellos que no la tienen, es un requisito básico en este tipo de estudios. En el presente trabajo resulta crucial tanto la clasificación de los dos grupos de estudio como la división en subgrupos de los paciente alcohólicos (con y sin EHA y abusadores o dependientes del alcohol).

En cuanto al reclutamiento de pacientes alcohólicos, este se realizó a través de una unidad médica especializada, a la que los pacientes habían sido remitidos tras una valoración previa en la que se había detectado un consumo perjudicial de alcohol en forma de abuso o dependencia. Aunque no existe un acuerdo global sobre la cuantía del consumo de alcohol necesaria para considerarla como perjudicial, el consumo medio de los pacientes reclutados se encontró muy por encima de los valores utilizados habitualmente<sup>128</sup>.

Con respecto a la clasificación de los pacientes alcohólicos en dependientes y abusadores, se siguieron las recomendaciones vigentes para su diagnóstico en el momento de su inclusión, aplicando los criterios recogidos en el manual DSM-IV-TR, que han sido detallados previamente<sup>28</sup>.

Por último, en lo que afecta al diagnóstico de EHA, la prueba fundamental para establecerlo es la biopsia hepática. Es necesario tener en cuenta que, por razones éticas, resulta difícil plantear la realización de una biopsia hepática exclusivamente con fines de investigación, debido a sus potenciales complicaciones<sup>260</sup>. Es por ello que el criterio seguido en nuestro estudio para la clasificación de los pacientes sin EHA es la normalidad clínica, ecográfica y analítica en pacientes con un consumo de alcohol similar al de los pacientes cirróticos. Esta estrategia es similar a la adoptada en otros trabajos<sup>261,262</sup>, y coincide con las últimas guías clínicas publicadas, que recomiendan la

realización de una biopsia hepática sólo en aquellos pacientes con sospecha de afectación hepática grave por el consumo de alcohol y en los que la biopsia puede modificar la actitud terapéutica o con la finalidad de incluir a pacientes en ensayos clínicos para el desarrollo de nuevos tratamientos<sup>128</sup>. Asimismo, diversos trabajos han demostrado la buena correlación existente entre los hallazgos de la biopsia hepática y las pruebas no invasivas empleadas habitualmente<sup>263-266</sup>.

### **Selección de genes candidatos**

Para reducir el riesgo de un falso positivo en los estudios genéticos de asociación, resulta de capital importancia que exista una plausibilidad biológica en la asociación planteada, es decir, que los genes seleccionados presenten una adecuada probabilidad *a priori* de asociación con la enfermedad. Habitualmente, esta selección se realiza a partir de la información obtenida mediante estudios previos que hayan generado la suficiente evidencia como para considerar a un gen determinado como "candidato" a estar relacionado con la fisiopatología de una enfermedad. Estos estudios pueden ser de diferentes tipos: identificación de proteínas implicadas en la patogenia, diferencias en la respuesta a fármacos, identificación de genes en modelos animales previos, estudios de enfermedades familiares, rastreos hologenómicos o estudios de asociación previos<sup>267</sup>. En nuestro caso, además de una revisión exhaustiva de la información disponible, se realizó una búsqueda a través de las bases de datos existentes de polimorfismos en dianas potenciales de micro-ARN, tal y como se ha explicado. Consideramos, por tanto, que se han seleccionado variantes genéticas con una razonable probabilidad *a priori* de asociación con la enfermedad y, por tanto, que se ha minimizado el riesgo de un falso positivo.

**Obtención y procesamiento de las muestras**

Los errores en el proceso de genotipado pueden alterar el resultado de un estudio y se estima que, incluso extremando las precauciones y utilizando tecnología de última generación, el porcentaje de error en el genotipado en este tipo de estudios se sitúa entre el 1% y el 3%<sup>268</sup>. Por tanto, se trata de errores que pueden afectar de forma definitiva a la validez de los resultados de un estudio de asociación genética<sup>269</sup>.

En nuestro estudio se aplicó un estricto protocolo de procesamiento de las muestras de sangre periférica hasta obtener el ADN, tal y como se ha detallado, extremando en todo momento las medidas de esterilidad con la finalidad de evitar la contaminación de las muestras. En cuanto al proceso de genotipado, se llevó a cabo un control de la calidad metodológica mediante la aplicación de normas fundamentales para la detección de errores, como la duplicación de muestras en diferentes placas, la utilización de pocillos vacíos de control, y la comprobación de la coherencia de los resultados durante el genotipado de la muestra mediante la comparación de resultados de diferentes placas entre sí y con los datos previos disponibles<sup>270</sup>. Además, se trató de minimizar la aparición de sesgos mediante la utilización de placas mixtas con muestras de casos y controles en cada análisis, y la repetición del genotipado de aquellas muestras que no alcanzasen un grado de discriminación adecuado en un primer análisis<sup>254</sup>. El cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los polimorfismos estudiados, así como la similitud de las frecuencias alélicas obtenidas en controles con las descritas en estudios previos en poblaciones similares, hablan a favor de una correcta determinación del genotipo de los individuos incluidos en el presente estudio<sup>271</sup>. Además, como marcadores de calidad, cabe destacar que el porcentaje de pocillos de control contaminados a lo largo del proceso de genotipado fue inferior al 5%, al igual que el porcentaje de muestras en las que fue necesario una repetición del

genotipado, cumpliendo los requisitos de calidad habituales<sup>254</sup>. Con todo ello, en el presente trabajo se puede considerar descartada de forma razonable la existencia de este sesgo, al menos en un porcentaje significativo que pudiese interferir en la validez de los resultados obtenidos<sup>272</sup>.

## **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Independientemente de las consideraciones anteriores, el hallazgo de una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de una determinada enfermedad y una variante genética puede deberse a las siguientes circunstancias:

-Existencia de una relación directa entre la variante genética y el desarrollo de la enfermedad, debido a que dicha variante es un factor de riesgo en su patogenia.

-Existencia de una relación indirecta entre la variante genética y el desarrollo de la enfermedad, debido a que dicha variante está asociada con otra que es la que sí tiene relación directa con dicha patología (fenómeno denominado desequilibrio de ligamiento). En este caso, podría decirse que la variante analizada es, en realidad, un "marcador de enfermedad", pero no un factor de riesgo.

-Existencia de un falso positivo, que supone que la asociación estadística encontrada se debe a la casualidad o a la presencia de sesgos, como los anteriormente descritos.

Asimismo, la ausencia de relación entre un polimorfismo y el desarrollo de una enfermedad puede deberse a una de las siguientes posibilidades:

-La variante genética analizada no está asociada con la enfermedad.

-Existencia de un falso negativo, debido a la presencia de sesgos o a un bajo



poder estadístico del estudio.

### **Relación directa polimorfismo-enfermedad**

Existen varios factores que influyen en que se acepte la existencia de una relación causal entre una variante genética y el desarrollo de una enfermedad determinada. Entre ellos se incluye la fuerza de la asociación, la replicación de los resultados y la plausibilidad biológica. Tal y como se ha mencionado, uno de los problemas fundamentales que se plantean en este tipo de estudios radica en el proceso de selección de genes candidatos y, dentro de cada gen, en elegir los polimorfismos potencialmente asociados con la enfermedad objeto de estudio<sup>267</sup>. Dicho proceso determina la probabilidad *a priori* de asociación, que desde una perspectiva bayesiana es importante para la interpretación de los resultados. Estudios en los que esta probabilidad sea baja, requieren un análisis cauteloso de los resultados obtenidos, aunque se haya encontrado una asociación estadísticamente significativa. Así, en estos casos podría exigirse una mayor fuerza de asociación o una replicación externa más amplia de los resultados para su consideración y aceptación<sup>250</sup>. En el presente trabajo se ha seguido un sistema de selección de genes candidatos, tal y como se ha explicado previamente, con el objetivo de analizar únicamente genes candidatos que presenten una probabilidad *a priori* de asociación adecuada.

En todo caso, la situación ideal en un estudio genético de asociación es aquella en la que existe una plausibilidad biológica demostrada, es decir, que el polimorfismo estudiado altere la función de la proteína codificada por el gen y que dicha proteína tenga un papel en la patogenia de la enfermedad<sup>250,252</sup>. No se puede olvidar, sin embargo, que el conocimiento exacto de la función de una proteína dentro de la fisiopatología de una enfermedad o de la funcionalidad de un polimorfismo resulta muy

complejo; de hecho, sólo podría alcanzarse utilizando modelos humanos modificados genéticamente. En este sentido, conviene mencionar el ejemplo de la asociación de la variante genética 10109 C>G (rs7384099) del gen *PNPLA3* con la EHA. Aunque no se conoce con exactitud la relación entre la proteína codificada por este gen (adiponutrina) y la EHA, la asociación entre esta variante genética y esta enfermedad parece consistente en los diferentes estudios realizados<sup>176-178</sup>. De igual forma, no podemos olvidar que ciertos polimorfismos, considerados inicialmente como silentes, han adquirido interés tras demostrarse su funcionalidad como regiones de unión de micro-ARN<sup>222</sup>.

Es importante tener en cuenta estas consideraciones porque, dada la novedad del trabajo planteado en esta tesis, la implicación de algunos de los genes que hemos analizado en el desarrollo de alcoholismo ha sido estudiada sólo parcialmente. Aunque parece claro que los procesos de activación de la respuesta inflamatoria en el hígado y el sistema nervioso central juegan un papel clave en el desarrollo de la mayoría de los trastornos asociados al consumo de alcohol<sup>31,33,73,273</sup>, existen pocos datos disponibles para algunos de los genes estudiados. Por tanto, resulta complejo establecer hipótesis de trabajo que puedan aplicarse de forma general, dado que la fisiopatología de cada uno de ellos presenta variaciones<sup>274</sup>.

En cualquier caso, el papel de la vía del TLR4, tanto en el desarrollo de la EHA como de la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol, parece bien establecido a la luz de los resultados de los estudios publicados en los últimos años<sup>51,70</sup>. Además, diferentes trabajos han demostrado la implicación de varios micro-ARN como reguladores de esta vía<sup>275-277</sup>, y algunos de ellos ya se han relacionado claramente con el alcoholismo o con los trastornos asociados al consumo de alcohol<sup>78,86,278-280</sup>.

Es preciso considerar también que no se conoce con exactitud la funcionalidad

de los polimorfismos analizados en la mayor parte de los casos, y que los estudios funcionales existentes son en muchos casos experimentos *in vitro* o en modelos animales, cuyos resultados no han sido confirmados en humanos (aspecto este, por otra parte, complejo de analizar). Además, no existen trabajos previos que analicen la relación entre los polimorfismos estudiados y el alcoholismo que permitan comparar nuestros resultados.

Por todo ello, es necesario interpretar con cautela los resultados obtenidos y, probablemente, serán necesarias nuevas investigaciones para aclarar tanto la funcionalidad como la repercusión de los polimorfismos analizados en pacientes alcohólicos y su posible implicación en la fisiopatología de los diferentes trastornos asociados al consumo de alcohol.

Finalmente, no debemos olvidar el hecho de que el hallazgo de una asociación estadística entre un polimorfismo y el desarrollo de una determinada enfermedad puede deberse a que este se encuentre implicado en un conjunto de interacciones entre diferentes variantes genéticas que influyan en la aparición de la patología estudiada<sup>281</sup>. Además, estas interacciones también pueden darse con factores ambientales que modifican la expresión y regulación de ciertos genes<sup>282</sup>. Muchas de estas interacciones todavía no se conocen con exactitud y contribuyen a aumentar la complejidad de la relación genotipo-fenotipo y a dificultar la interpretación de los resultados en este tipo de estudios.

### **Relación indirecta polimorfismo-enfermedad**

El hallazgo de una relación entre un polimorfismo y el desarrollo de una enfermedad puede deberse también a una asociación indirecta debida a que el

polimorfismo actúe como marcador de la presencia de otra variante o variantes con las que esté en desequilibrio de ligamiento. Serían estas variantes, y no el polimorfismo estudiado, las que poseerían una relación causal directa con la patología estudiada. Por tanto, el polimorfismo analizado se consideraría como un marcador de la presencia dicha enfermedad, pero no un factor de riesgo implicado en su patogenia.

El fenómeno conocido como desequilibrio de ligamiento se produce cuando dos alelos de un mismo cromosoma aparecen juntos con mayor frecuencia de la esperable por el azar<sup>281,283</sup>. La aparición de este fenómeno requiere de la existencia de dos mutaciones en dos *loci* muy cercanos del mismo cromosoma, de forma que ambos se sitúen en un pequeño fragmento de ADN que no se vea alterado por la recombinación genética con el paso de las generaciones, por recurrencias de la misma mutación o por conversión genética<sup>254</sup>. De esta forma, la frecuencia de aparición de ambas mutaciones en la descendencia es mayor de la esperable (desequilibrio de ligamiento)<sup>284</sup>. Cuanto mayor sea la distancia entre dos puntos del genoma, menor es la probabilidad de aparición de desequilibrio de ligamiento, aunque se han detectado regiones del genoma en las que existe un alto grado de desequilibrio de ligamiento, limitadas por regiones en las que dicho trastorno apenas existe<sup>285</sup>. Los fragmentos con un alto grado de desequilibrio de ligamiento pueden constituir bloques de haplotipos, o combinaciones de alelos de diferentes *loci* de un cromosoma transmitidos juntos a la descendencia y conservados evolutivamente<sup>286,287</sup>. La diversidad de los bloques de haplotipos aumenta de forma paralela a la identificación de nuevos polimorfismos y, aunque añaden mayor complejidad, pueden ayudar a enriquecer y mejorar los estudios de asociación genética<sup>288</sup>. Además, se ha planteado la posibilidad de que existan determinados polimorfismos en cada bloque de haplotipos que actúen como marcadores y cuya detección facilite la identificación de estos haplotipos<sup>289,290</sup>.

### **Ausencia de relación polimorfismo-enfermedad**

La ausencia de relación de un polimorfismo con una enfermedad puede deberse, en primer lugar, a la ausencia de funcionalidad de este en el proceso fisiopatológico o a la falta de implicación de la proteína codificada en el mismo. Además, aunque el polimorfismo tenga repercusión funcional o la proteína desempeñe un papel en la enfermedad, cabe la posibilidad de que la existencia de una variante genética concreta no provoque una alteración suficiente como para aumentar el riesgo de padecer una enfermedad, o bien que esto solo suceda ante la actuación concomitante de otros factores ambientales o genéticos. En todo caso, dado que un mismo gen puede presentar varios polimorfismos, la ausencia de asociación con una variante concreta no descarta la existencia de asociación entre dicho gen y la enfermedad estudiada.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

No existe un criterio establecido sobre el modo idóneo de llevar a cabo el análisis estadístico en los estudios de asociación genética, pero sí está claro que este debe responder a necesidades concretas de la investigación realizada y estar orientado a mantener el equilibrio entre los errores  $\alpha$  y  $\beta$ .

En primer lugar, se ha utilizado de manera habitual el test  $\chi^2$  como método inicial de valoración de la asociación entre la presencia de enfermedad y la distribución genotípica de los diferentes polimorfismos estudiados, seguido por el estudio de la presencia alélica. El análisis de la frecuencia alélica se ha realizado con finalidad únicamente exploratoria, sin calcular la OR, ya que esto implica duplicar artificialmente el tamaño muestral<sup>291</sup>.

Tras el análisis univariante, es necesario demostrar si la asociación de los

polimorfismos con la enfermedad estudiada es independiente de los potenciales factores de confusión<sup>292</sup>. Para ello se ha utilizado a regresión logística multivariante, que nos permite también obtener el modelo de herencia para cada variante genética.

Es preciso considerar que los métodos estadísticos habitualmente empleados en los estudios de asociación genética se basan en que una determinada variante sea directamente responsable del desarrollo de una enfermedad, ignorando las interacciones genéticas o ambientales en dicho proceso<sup>293</sup>. Este hecho supone una limitación habitual en este tipo de trabajos, aunque se trata de un paso fundamental antes de plantear la búsqueda de interacciones<sup>293</sup>. En el campo del micro-ARN y el alcoholismo, la investigación se encuentra todavía en fases iniciales de forma global, lo que supone una dificultad añadida plantear la presencia de interacciones.

### **Ajuste del valor de $P$**

Otro aspecto controvertido en este tipo de estudios es la necesidad o no de usar un valor de  $P$  ajustado por comparaciones múltiples. En el presente trabajo no se ha realizado una corrección de la misma, dado que los polimorfismos estudiados están potencialmente asociados con la respuesta inflamatoria inducida por el alcohol, lo que aumenta la probabilidad *a priori* de su asociación con el alcoholismo o la EHA. Este enfoque, utilizado también en estudios previos<sup>294,295</sup>, evita el incremento del riesgo de falsos negativos, a diferencia de planteamientos estadísticos basados en la corrección de la significación con métodos de ajuste como el de Bonferroni<sup>296</sup>. La confirmación o no de la asociación obtenida en este tipo de análisis debe basarse en la integración de diferentes resultados y su plausibilidad biológica, lo cual está en línea con nuestro planteamiento<sup>297</sup>. Además, se ha comprobado que el uso combinado de las tablas 3x2 de genotipos y de las tablas 2x2 de frecuencia y presencia alélicas reduce de forma

sustancial el error tipo  $\beta$  del estudio (aumentando por tanto su potencia), sin un ascenso apreciable del error tipo  $\alpha$  pese a multiplicar el número de contrastes<sup>238</sup>.

### **Potencia estadística de nuestro estudio**

El cálculo del poder estadístico de un estudio es un elemento fundamental para permitirnos valorar su capacidad de detectar diferencias. La potencia estadística mínima requerida en los estudios genéticos de asociación es de 0,8 (es decir, un 80% de probabilidades de detectar una asociación existente en realidad)<sup>298</sup>. Por debajo de este valor aumenta el riesgo de aparición de falsos negativos. Igualmente se ha estimado que la capacidad de replicación de los resultados obtenidos en un estudio de asociación genética aumenta con un tamaño muestral superior a 150 individuos<sup>299</sup>.

El presente trabajo cumple ambos requisitos, si bien cabe recordar que la potencia estadística no depende únicamente del tamaño muestral, sino también de la magnitud de la diferencia que queremos detectar. En los estudios de genes candidatos, la detección de asociaciones significativas con frecuencias alélicas o genotípicas similares en los casos y en los controles requiere tamaños muestrales muy grandes. Por ejemplo, en el caso del polimorfismo de *IL12B* analizado, las frecuencias fueron muy parecidas en ambos grupos, lo que implica que hubiesen sido necesarios más de 12000 casos y el mismo número de controles para mantener una potencia estadística superior al 80%.

Debido al diseño del presente trabajo, que analiza varios polimorfismos de los que no existen datos previos de las frecuencias esperadas en casos y controles, el cálculo de la potencia estadística se ha realizado para diferentes valores de OR y un valor establecido de la frecuencia esperada del polimorfismo. Una vez realizado el

estudio, el análisis de los resultados obtenidos nos indica que será preciso incrementar el tamaño muestral para descartar con mayor seguridad la presencia de asociación en aquellos polimorfismos con frecuencias muy similares en los casos y en los controles (como en el caso de *IL12B*).

## **POLIMORFISMOS GENÉTICOS ESTUDIADOS**

### **Polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* (rs2910164)**

En el presente trabajo hemos encontrado por primera vez una asociación entre un polimorfismo de micro-ARN y el alcoholismo. En concreto, el alelo C del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* tiene una mayor prevalencia en pacientes con abuso o dependencia de alcohol que en sujetos controles. Aunque no existen estudios previos que hayan analizado directamente el papel de dicho micro-ARN en estas patologías, el reciente hallazgo de su sobreexpresión en el cerebro de pacientes alcohólicos supone una base importante para establecer un papel del mismo en la neurobiología del alcoholismo<sup>86</sup>.

En todo caso, para explicar la asociación encontrada y su potencial relevancia, es necesario, en primer lugar, exponer la función de miR-146a en la vía inflamatoria mediada por los receptores TLR4. Así, está claramente establecido que el consumo de alcohol favorece el paso del LPS bacteriano al torrente sanguíneo, cuya unión a los receptores CD14 de las células de Kupffer es capaz de activar los receptores TLR4, iniciando la respuesta inflamatoria a nivel hepático<sup>43,46</sup>. De forma similar, estos receptores se encuentran implicados también en la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol<sup>300</sup>. En ambos casos, la activación de esta vía inflamatoria de TLR4 induce a través del NFκB la secreción de citocinas inflamatorias (como TNFα o IL-1β),



que, a su vez, estimulan la síntesis de miR-146a<sup>99</sup>. Este micro-ARN actúa, por su parte, como regulador negativo de la vía TLR4/NFκB, reduciendo la expresión de genes que codifican proteínas pro-inflamatorias como IRAK1, IRAK2 o TRAF6<sup>103,301</sup>. En resumen, es posible afirmar que este micro-ARN es un regulador negativo de la vía TLR4 a través de un sistema de retroalimentación. Dado que esta vía desempeña un papel clave en la inflamación inducida por el consumo de alcohol, podemos establecer por tanto un papel para miR-146a en la misma.

En concreto, la importancia de la neuroinflamación inducida por etanol a través de la vía TLR4 ha sido demostrado al apreciarse una reducción de la respuesta inflamatoria provocada por el etanol en el sistema nervioso central en ratones *knockout* para TLR4<sup>79,302</sup>. De esta forma, alteraciones en la función de miR-146a podrían aumentar o disminuir la intensidad de la neuroinflamación tras el consumo de alcohol. Este efecto de miR-146a en el alcoholismo todavía no ha sido demostrado directamente, pero sí se ha comprobado que este micro-ARN es capaz de reducir la secreción de citocinas inflamatorias a través de la vía TLR-4/NFκB en las células gliales<sup>102</sup>. Aunque estos datos parecen establecer de forma clara la función del gen *MIR146A* en la neuroinflamación inducida por alcohol, resulta más complejo determinar el papel concreto del polimorfismo 60 C>G en el alcoholismo y la neuroinflamación. Así, se ha descrito que el alelo C de este polimorfismo conlleva una reducción en la producción de miR-146a, por lo que disminuiría su acción inhibitoria sobre sus genes diana en la vía TLR4/NFκB<sup>192,193</sup>, con el balance final de un incremento la respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta estos datos, se puede plantear la hipótesis de que la presencia del alelo C conllevaría una reducción de la producción de miR-146a y un aumento de neuroinflamación inducida por el alcohol a través de la vía TLR4/NFκB, lo que explicaría la mayor frecuencia del alelo C en pacientes con abuso o dependencia de

alcohol. Este hecho, a su vez, podría estar relacionado con un aumento del riesgo de desarrollar dependencia del alcohol<sup>273</sup>.

Nuestra hipótesis, sin embargo, no explicaría los resultados de otros estudios funcionales (que asocian el alelo C con niveles más elevados de miR-146a<sup>303</sup>), ni tampoco el hallazgo de niveles elevados de miR-146a en el cerebro de pacientes alcohólicos<sup>86</sup>. Estas discrepancias podrían deberse a los efectos pleiotrópicos de miR-146a, difíciles de predecir, a las limitaciones propias de los estudios *in vitro*, cuyos resultados hay que analizar con cautela, o a posibles cambios en la expresión de miR-146a en función del patrón de consumo de alcohol.

En cualquier caso, consideramos que la asociación descrita entre el polimorfismo 60 G>C del gen *MIR146A* y el alcoholismo refuerza la asociación de este micro-ARN con dicha enfermedad, y sugiere la implicación de esta variante alélica en la susceptibilidad a la misma, si bien serán necesarios más estudios para determinar su papel y punto de acción exactos.

#### **Polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2* (rs11614913)**

Nuestros resultados no muestran una asociación significativa entre el alcoholismo y el polimorfismo 78 C>T del gen *MIR196A2*. Las funciones más conocidas de este micro-ARN son la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo embrionario, como las del grupo HOX<sup>304</sup>, u otras proteínas estructurales<sup>195,305</sup>; pero entre sus dianas se encuentran también genes de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria a través de la vía TLR4/NFκB, como *TRAF6*<sup>196</sup>. Esto permite plantear que miR-196a2 puede estar relacionado con el alcoholismo, aunque no lo esté el polimorfismo concreto analizado.

Con respecto a la función de este polimorfismo, se ha descrito un aumento de la síntesis de miR-196a2 en los portadores del alelo C<sup>198</sup>, hecho que probablemente conlleve una disfunción en su acción reguladora, contribuyendo así al desarrollo de diversas patologías. Teniendo en cuenta el tipo de proteínas que regula, la presencia de este polimorfismo se ha relacionado tanto con enfermedades congénitas<sup>306</sup> como con el desarrollo de neoplasias, fundamentalmente de origen digestivo<sup>307</sup>. En este sentido, existen estudios que han relacionado este polimorfismo con el desarrollo de carcinoma hepatocelular en pacientes cirróticos<sup>308</sup>, aunque los datos son contradictorios y un metanálisis reciente no ha confirmado esta asociación<sup>309</sup>.

Aunque se dispone de menos datos respecto a la relación de este polimorfismo con enfermedades inflamatorias, sí se ha descrito la asociación de esta variante con enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>310</sup> y con colitis ulcerosa<sup>311</sup>. En todo caso, la ausencia de asociación encontrada con el alcoholismo podría deberse a que el propio miR-196a2 o la variante genética analizada no desempeñan un papel relevante en el desarrollo de alcoholismo o en la aparición de hepatopatía en pacientes alcohólicos.

### **Polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* (rs61764370)**

En nuestro trabajo no se ha encontrado una asociación entre el polimorfismo 3377 T>G del gen *KRAS* y el abuso o dependencia alcohólica o la EHA. Sin embargo, la implicación de dicho gen y de diferentes vías metabólicas e inflamatorias reguladas por el mismo en el alcoholismo ha sido comprobada previamente<sup>209</sup>. Por un lado, el propio consumo de alcohol modifica la expresión de *KRAS*, que disminuye tras la administración de dicha sustancia; por otro lado, en ratones modificados genéticamente se ha observado que una menor actividad de *KRAS* conllevaba un menor aumento del deseo de consumo de alcohol tras el cese de la administración de dicha sustancia en

animales con consumo crónico previo<sup>209</sup>. Estos datos apoyan la hipótesis de que *KRAS* se encuentre implicado en la fisiopatología de la abstinencia y dependencia del alcohol. Además, este gen se encuentra relacionado con la regulación de otras vías potencialmente asociadas al alcoholismo, como las de NFκB<sup>312</sup> y PI3K<sup>313</sup> (fosfatidilinositol 3 quinasa), por lo que modificaciones en la acción de *KRAS* inducidas por el alcohol podrían variar a su vez la transmisión de señales en estas vías<sup>209,314</sup>.

El polimorfismo 3377 T>G se localiza en un punto diana de varios micro-ARN de la familia let-7<sup>206,207</sup>, y recientes hallazgos muestran la sobreexpresión de micro-ARN de la familia let-7 (como let-7g o let-7f) en el cerebro de pacientes alcohólicos<sup>86</sup>, o su posible implicación en el desarrollo de EHA<sup>208</sup>. Por consiguiente, parece existir una base sólida para plantear el papel del gen *KRAS* y, en menor medida, de dicha variante genética en el alcoholismo, aunque no ha sido comprobado de forma directa.

Respecto al efecto funcional del polimorfismo, la presencia del alelo G induce un aumento de la expresión de *KRAS*, y se han observado menores niveles de let-7a, b, d y g en portadores de dicha variante<sup>206</sup>. Sin embargo, la ausencia de asociación en nuestro trabajo entre el polimorfismo estudiado y el alcoholismo, la dependencia alcohólica o la EHA, apuntan hacia una falta de implicación de dicha variante genética en los fenotipos analizados, salvo que se trate de un falso negativo. En todo caso, sí resulta posible que otros polimorfismos localizados en ese mismo gen estén asociados con el alcoholismo, dada la existencia de los datos previos anteriormente mencionados.

**Polimorfismo 2124 G>T del gen *IL12B* (rs1368439)**

En el presente estudio no se halló relación entre el alcoholismo y el polimorfismo 2124 G>T de *IL12B*. Sin embargo, estudios previos han demostrado la relación entre niveles aumentados de IL-12 y alcoholismo<sup>61</sup>, así como la implicación de la misma en el desarrollo de EHA, relacionándose con formas graves de la misma<sup>175</sup>. Esta interleucina se encuentra íntimamente relacionada con la activación y diferenciación linfocitaria, y constituye uno de los productos finales de la vía iniciada por los receptores TLR. Además, actúa como regulador de la misma<sup>315</sup>, y se ha postulado que alteraciones en esta función reguladora, como las originadas por la existencia de polimorfismos, pueden contribuir al desarrollo de enfermedades con un importante componente inflamatorio, como la esclerosis múltiple<sup>316</sup>.

El polimorfismo aquí analizado se encuentra en una región de unión potencial de micro-ARN, y algunos algoritmos de predicción han sugerido que, en concreto miR-23, tiene como diana dicha región (TargetScan 6.2)<sup>214,215</sup>. El polimorfismo 2124 G>T de *IL12B* ha sido únicamente estudiado hasta el momento actual en el asma<sup>317</sup>, por lo que no existen estudios en pacientes alcohólicos con los que poder establecer una comparación de nuestros hallazgos. Previamente, sí se ha analizado por nuestro grupo de investigación la relación del polimorfismo 1188 A>C de *IL12B* con el alcoholismo, sin encontrar resultados significativos<sup>174</sup>. En el presente estudio, la diferente distribución alélica observada no alcanzó la significación estadística, por lo que no podemos concluir que exista una asociación entre los fenotipos analizados en nuestro trabajo y esta variante genética. Es posible, por lo tanto, que la participación de IL-12 en la patogenia del alcoholismo y sus complicaciones asociadas no sea tan relevante como para que variantes alélicas en dicho gen modifiquen la susceptibilidad a padecer estas

enfermedades, o bien que las variantes alélicas analizadas hasta la fecha no sean capaces de modular la participación de esta proteína.

### **Polimorfismo 5000C>T del gen *IL16* (rs1131445)**

En nuestro trabajo, tampoco encontramos una asociación entre el polimorfismo analizado del gen *IL16* y alcoholismo, definido como abuso o dependencia del alcohol, o la presencia de hepatopatía alcohólica. Esta interleucina actúa fundamentalmente sobre los linfocitos T, y su actividad está regulada, entre otras vías, a través de la acción de determinados micro-ARN<sup>222,223</sup>. Además, existe una relación entre IL-16 y la vía TLR4/NFκB, ya que recientes trabajos han mostrado que esta citocina lleva a cabo su acción en parte a través la inhibición de las MAPK y de la producción de NFκB<sup>318,319</sup>.

No se conoce con exactitud, sin embargo, la funcionalidad del polimorfismo 5000C>T, aunque está situado en una región que constituye una diana potencial para diferentes micro-ARN, como miR-125 y miR-4319 (TargetScan 6.2)<sup>222,223</sup>. No existen tampoco estudios previos que hayan analizado el papel del mismo en el alcoholismo, pero sí se ha estudiado su implicación en otras patologías, encontrándose una asociación de la presencia del alelo T con la enfermedad de Graves<sup>225</sup>. Estudios en enfermedad coronaria no han demostrado su relación con esta variante genética, aunque sí con otros polimorfismos de *IL16*<sup>221,320</sup>.

Con respecto a los resultados del presente trabajo, resulta difícil dada la escasez de datos previos plantear una hipótesis para la falta de asociación encontrada entre esta variante genética y el alcoholismo. Es posible, por tanto, que o bien la IL-16 no sea muy relevante en la inflamación asociada al alcoholismo o bien que los polimorfismos en esta citocina no modifiquen de manera sustancial la funcionalidad de la misma.

**Polimorfismo 3114 C>T del gen *IL1R1* (rs3917328)**

Los datos de nuestro trabajo muestran una mayor frecuencia del alelo T de este polimorfismo en controles sanos que en pacientes alcohólicos, aunque dicha diferencia no alcanzó la significación estadística en el análisis multivariante. El papel de IL-1 en la respuesta inmune resulta crucial, fundamentalmente en lo que concierne a la activación y diferenciación de linfocitos T<sup>321</sup>. La función de los receptores IL1R1, además, se encuentra íntimamente ligada a la vía de TLR4. Ello es debido, por una parte, a que ambos receptores comparten gran parte de su estructura y su activación estimula a varios mediadores compartidos, como IRAK1 o TRAF6<sup>322-324</sup>, y por otra, a que el LPS bacteriano puede activar también los receptores IL1R1<sup>325</sup>. La IL-1 desempeña así un papel relevante tanto en la neuroinflamación<sup>326</sup> como en la inflamación hepática<sup>327</sup>. Además, estudios previos indican que variantes genéticas de *IL1* e *IL1R1* pueden estar relacionadas con el alcoholismo *per se*<sup>229,328</sup>. Esta implicación de IL-1 también se observa, como ocurre con otras interleucinas, en el desarrollo de otros procesos patológicos (degenerativos<sup>329</sup> o infecciosos<sup>330</sup>) del sistema nervioso central.

Según lo expuesto, resulta lógico suponer que alteraciones en la función o expresión de IL1R1, como las provocadas por ciertos polimorfismos, podrían estar implicadas en el desarrollo del alcoholismo. Además, el polimorfismo 3114 C>T se encuentra en una región diana de varios micro-ARN<sup>331</sup>, entre ellos miR-19 que, a su vez, regula la expresión de algunos tipos de TLR y la transmisión del estímulo inflamatorio a través de la vía de NFκB<sup>332,333</sup>.

La diferente distribución alélica en pacientes alcohólicos y controles sanos encontrada en nuestro trabajo alcanza una significación estadística marginal únicamente en el análisis univariante, sin confirmarse en el análisis multivariante una vez que se introduce la edad como potencial factor de confusión. Sin embargo, dado que no

disponemos de la edad al diagnóstico de los pacientes sino de la edad en el momento de recoger la muestra de ADN, resulta muy difícil interpretar este resultado o plantear una posible influencia de la edad como factor de confusión en la asociación de este polimorfismo con el abuso o la dependencia de alcohol.

En todo caso, cabe destacar la importancia de la localización de esta variante en el punto de unión de varios micro-ARN al gen de *IL1R1*, modificando la acción reguladora de los mismos. Este hecho podría sugerir, por tanto, que la mayor frecuencia del alelo T en controles sanos descrita en nuestro trabajo constituya un factor "protector" frente al desarrollo de alcoholismo, aunque la falta de significación estadística limita el alcance de nuestras conclusiones. Por tanto, serán necesarios nuevos estudios que analicen, en primer lugar, la repercusión funcional real de este polimorfismo y, en segundo lugar, el posible papel de los micro-ARN que se unen a dicha región en la patogenia del alcoholismo o diversos trastornos asociados al consumo de alcohol.

#### **Polimorfismo 3400 A>G del gen *NFKB1* (rs4648143)**

En el presente trabajo no se encontró una asociación significativa entre esta variante genética y el alcoholismo. El papel del NFκB en la vía iniciada por la activación de los receptores TLR4 es primordial, actuando como eje de la misma y factor regulador de la transcripción de numerosas citocinas proinflamatorias. Estudios previos han mostrado una relación clara entre NFκB y procesos inflamatorios o de activación de la respuesta inmune a nivel cerebral<sup>334-336</sup>. Además, con respecto al alcoholismo, se ha encontrado asociación entre variaciones en el gen que lo codifica y la dependencia alcohólica<sup>337</sup> o la EHA<sup>233</sup>.



Con respecto al polimorfismo estudiado, se encuentra en una región que constituye una diana potencial para miR-557, cuyo papel como regulador de la expresión de *NFKBI* ha sido previamente estudiado<sup>234,338</sup>. Este hecho podría implicar la potencial relevancia de este polimorfismo en el alcoholismo, al igual que sucede con otras variantes del mismo gen<sup>233</sup>. Sin embargo, la escasa frecuencia obtenida para el alelo menor de este polimorfismo limita las posibilidades de obtener resultados significativos, al igual que ha ocurrido en otros trabajos<sup>338</sup>. Por tanto, aunque la implicación del NFκB en la inflamación asociada al consumo de alcohol es segura, y se ha encontrado asociación previamente entre otro polimorfismo de este gen y la EHA<sup>233</sup>, podemos afirmar que el polimorfismo estudiado en este trabajo no parece guardar relación con el alcoholismo o con las complicaciones asociadas.



# *CONCLUSIONES*

---



1. No se han encontrado diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos analizados en los genes *MIR146A*, *MIR196A2*, *KRAS*, *IL12B*, *IL16*, *IL1RI* y *NFKB1*, al comparar pacientes alcohólicos sin hepatopatía y pacientes con cirrosis hepática alcohólica.
2. No se ha identificado ninguna asociación significativa entre la presencia de alcoholismo, entendido como abuso o dependencia de alcohol, y las variantes alélicas estudiadas en los genes *MIR196A2*, *KRAS*, *IL12B*, *IL16*, *IL1RI* y *NFKB1*.
3. No hemos hallado ninguna diferencia significativa al comparar pacientes con dependencia y abuso del alcohol, en cuanto a distribución de los polimorfismos analizados en los genes *MIR146A*, *MIR196A2*, *KRAS*, *IL12B*, *IL16*, *IL1RI* y *NFKB1*.
4. La posesión del alelo C del polimorfismo 60 C>G del gen *MIR146A* se asocia con alcoholismo, entendido como abuso o dependencia del alcohol. Los datos previos sugieren que este alelo puede alterar la función reguladora de miR-146a sobre la vía TLR4/NFκB, implicada en la inflamación hepática y cerebral provocada por el alcohol, induciendo una mayor respuesta inflamatoria. Por ello, los resultados del presente trabajo sugieren que la posesión del alelo C conlleva un mayor riesgo de desarrollar alcoholismo, y constituyen la primera evidencia de la implicación de polimorfismos de micro-ARN en esta patología.



## BIBLIOGRAFÍA

1. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17593-8.
2. McGovern PE. *Ancient wine: The search of the origins of viniculture*. Oxford University Press 2007.
3. McGovern PE, Mirzoian A, Hall GR. Ancient Egyptian herbal wines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7361-6.
4. Henderson JS, Joyce RA, Hall GR, Hurst WJ, McGovern PE. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18937-40.
5. Guiraud V, Amor MB, Mas JL, Touze E. Triggers of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 2010;41:2669-77.
6. Fierro I, Ochoa R, Yáñez JL, Valderrama JC, Alvarez FJ. Mortalidad y mortalidad prematura relacionadas con el consumo de alcohol en España entre 1999 y 2004. *Med Clin (Barc)* 2008;131:10-3.
7. Problemas relacionados con el consumo de alcohol. Informe de un comité de expertos de la OMS. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1980.
8. Gómez MT. Alcohol y accidentes laborales en España: Revisión bibliográfica, 1995 - 2001. *Trastornos adictivos* 2002;4:244-55.
9. Global Status Report on Alcohol and Health 2011. World Health Organization. 2011. [Consultado 06-08-2013]. Disponible en: [http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/en/index.html](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html).
10. Encuesta Nacional de Salud 2011. Instituto Nacional de Estadística. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Consultado 03-12-13]. Disponible en: [http://www.mssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/DeterminantesSalud\\_DistribucionPorcentual.pdf](http://www.mssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/DeterminantesSalud_DistribucionPorcentual.pdf).
11. Encuesta Europea de Salud 2009. Datos preliminares. Instituto Nacional de Estadística. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Consultado 09-06-2012]. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p420&file=inebase&L=0>.
12. Informe sobre Alcohol. Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Febrero 2007.
13. Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2011/12. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Consultado 03-12-2013]. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/EDADES2011.pdf>.

14. Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias (ESTUDES), 1994-2010. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Consultado 03-12-2013]. Disponible en: [http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/ESTUDES\\_2010.pdf](http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/ESTUDES_2010.pdf).
15. Patrones de mortalidad en España, 2008. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. 2011. [Consultado 03-12-13]. Disponible en: [http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/Patrones\\_de\\_Mortalidad\\_en\\_Espana\\_2008.pdf](http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/mortalidad/docs/Patrones_de_Mortalidad_en_Espana_2008.pdf).
16. Mortalidad prematura y años potenciales de vida perdida relacionados con el consumo de alcohol en España y las distintas CCAA, en 2003 y 2004. Instituto de estudios de Alcohol y Drogas. Universidad de Valladolid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. [Consultado 09-06-2012]. Disponible en: <http://www.msps.es/alcoholJovenes/docs/tablasMortalidadPrematura03-04.pdf>.
17. Jane M, Borrell C, Nebot M, Pasarin MI. Impacto del tabaquismo y del consumo excesivo de alcohol en la mortalidad de la población de la ciudad de Barcelona: 1983-1998. *Gac Sanit* 2003;17:108-15.
18. Alseda M. Mortalidad atribuible al alcohol en Cataluña: 1994. *Rev Esp Salud Publica* 1998;72:25-31.
19. Criado-Alvarez JJ. Mortalidad atribuible al consumo de alcohol en Castilla-La Mancha (1980-1998). *Gac Sanit* 2003;17:438-9.
20. Yáñez JL, Del Rio MC, Alvarez FJ. Alcohol-related mortality in Spain. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:253-5.
21. Guitart AM, Espelt A, Castellano Y, Bartroli M, Villalbi JR, Domingo-Salvany A, et al. Impacto del trastorno por consumo de alcohol en la mortalidad: ¿hay diferencias según la edad y el sexo? *Gac Sanit* 2011;25:385-90.
22. Alcohol in the European Union. World Health Organization. 2012. [Consultado 09-06-2012]. Disponible en: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/alcohol-use>.
23. Ivano Scandurra R, Garcia-Altes A, Nebot M. Impacto social del consumo abusivo de alcohol en el estado español: Consumo, coste y políticas. *Rev Esp Salud Publica* 2011;85:141-7.
24. Agarwal DP. Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. *Alcohol* 2002;37:409-15.
25. Rodríguez-Martos Dauer A, Gual Sole A, Llopis Llacer JJ. La "unidad de bebida estandar" como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España. *Med Clin (Barc)* 1999;112:446-50.
26. European comision report: Alcohol in Europe. 2006. [Consultado 17-06-2012]. Disponible en: [http://ec.europa.eu/health-eu/news\\_alcoholineurope\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health-eu/news_alcoholineurope_en.htm).



27. Schuckit MA. Alcohol-use disorders. *Lancet* 2009;373:492-501.
28. American Psychiatric Association (2004). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed., Text Revision). Washington, DC: First, MB.
29. American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*.
30. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:720-30.
31. Wang HJ, Zakhari S, Jung MK. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol* 2010;16:1304-13.
32. Crews FT. Immune function genes, genetics, and the neurobiology of addiction. *Alcohol Res* 2012;34:355-61.
33. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. Sistema inmune y enfermedad hepática por alcohol. *Med Clin (Barc)* 2005;125:263-9.
34. Lieber CS. Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann Med* 1994;26:325-30.
35. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001;35:297-306.
36. Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006;43:S63-74.
37. Wieland P, Lauterburg BH. Oxidation of mitochondrial proteins and DNA following administration of ethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;213:815-9.
38. Mello T, Ceni E, Surrenti C, Galli A. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med* 2008;29:17-21.
39. Niemela O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1533-8.
40. Laso FJ, Almeida J, Torres E, Vaquero JM, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with an increased cytotoxic profile of circulating lymphocytes that may be related with the development of liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:876-85.
41. Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002;368:683-93.
42. Napolitano LM, Koruda MJ, Zimmerman K, McCowan K, Chang J, Meyer AA. Chronic ethanol intake and burn injury: evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity. *J Trauma* 1995;38:198-207.

43. Hanck C, Rossol S, Bocker U, Tokus M, Singer MV. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1998;33:606-8.
44. Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, et al. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology* 2000;31:932-6.
45. Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998;275:G387-92.
46. Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A. Gut-liver axis and sensing microbes. *Dig Dis* 2010;28:737-44.
47. Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, et al. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 2006;43:989-1000.
48. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3.
49. Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 2009;50:1258-66.
50. Lands WE. Cellular signals in alcohol-induced liver injury: a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:928-38.
51. Petrasek J, Mandrekar P, Szabo G. Toll-like receptors in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Gastroenterol Res Pract* 2010;2010.
52. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adaptor MyD88. *Hepatology* 2008;48:1224-31.
53. O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2011;11:163-75.
54. Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor alpha production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:1436-44.
55. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013.
56. Cook RT, Schlueter AJ, Coleman RA, Tygrett L, Ballas ZK, Jerrells TR, et al. Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:1746-58.

57. Cook RT, Zhu X, Coleman RA, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Ray NB, et al. T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol* 2004;33:175-81.
58. Laso FJ, Madruga JI, Giron JA, Lopez A, Ciudad J, San Miguel JF, et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption. *Hepatology* 1997;25:1096-100.
59. Kolber MA, Walls RM, Hinners ML, Singer DS. Evidence of increased class I MHC expression on human peripheral blood lymphocytes during acute ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 1988;12:820-3.
60. Niemela O, Juvonen T, Parkkila S. Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J Clin Invest* 1991;87:1367-74.
61. Laso FJ, Iglesias MC, Lopez A, Ciudad J, San Miguel JF, Orfao A. Increased interleukin-12 serum levels in chronic alcoholism. *J Hepatol* 1998;28:771-7.
62. Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, Marcos M, Pastor I, Hernandez Cerceno ML, et al. Decreased Peripheral Blood CD4(+) /CD25(+) Regulatory T Cells in Patients with Alcoholic Hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:1361-9.
63. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
64. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861-74.
65. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008;132:9-14.
66. Miranda RC, Pietrzykowski AZ, Tang Y, Sathyan P, Mayfield D, Keshavarzian A, et al. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:575-87.
67. Lautner R, Mattsson N, Scholl M, Augutis K, Blennow K, Olsson B, et al. Biomarkers for microglial activation in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011;2011:939426.
68. Clark KH, Wiley CA, Bradberry CW. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox Res* 2013;23:174-88.
69. Silva AP, Martins T, Baptista S, Goncalves J, Agasse F, Malva JO. Brain injury associated with widely abused amphetamines: neuroinflammation, neurogenesis and blood-brain barrier. *Curr Drug Abuse Rev* 2010;3:239-54.
70. Alfonso-Loeches S, Pascual M, Gomez-Pinedo U, Pascual-Lucas M, Renau-Piqueras J, Guerri C. Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia* 2012;60:948-64.
71. Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 2011;25 Suppl 1:S4-S12.

72. Loftis JM, Choi D, Hoffman W, Huckans MS. Methamphetamine causes persistent immune dysregulation: a cross-species, translational report. *Neurotox Res* 2011;20:59-68.
73. Valles SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 2004;14:365-71.
74. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 2008;5:10.
75. Zou J, Crews F. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF-kappaB and proinflammatory cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:777-89.
76. Ahmad A, Crupi R, Campolo M, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S. Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 2013;8:e57208.
77. Fang H, Wang PF, Zhou Y, Wang YC, Yang QW. Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury. *J Neuroinflammation* 2013;10:27.
78. Lippai D, Bala S, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Chronic Alcohol-Induced microRNA-155 Contributes to Neuroinflammation in a TLR4-Dependent Manner in Mice. *PLoS One* 2013;8:e70945.
79. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 2010;30:8285-95.
80. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007;55:453-62.
81. Bode JG, Ehrling C, Haussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 2012;24:1185-94.
82. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007;13:460-9.
83. Blanco AM, Pascual M, Valles SL, Guerri C. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport* 2004;15:681-5.
84. Blanco AM, Perez-Arago A, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C. Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J Neurochem* 2008;106:625-39.
85. Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol* 2005;175:6893-9.

86. Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD. Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:1928-37.
87. Manzardo AM, Gunewardena S, Butler MG. Over-expression of the miRNA cluster at chromosome 14q32 in the alcoholic brain correlates with suppression of predicted target mRNA required for oligodendrocyte proliferation. *Gene* 2013;526:356-63.
88. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001;294:797-9.
89. Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15:5633-40.
90. Ouyang YB, Stary CM, Yang GY, Giffard R. microRNAs: Innovative Targets for Cerebral Ischemia and Stroke. *Curr Drug Targets* 2012.
91. Hata A. Functions of MicroRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Annu Rev Physiol* 2012.
92. Khella HW, Bakhet M, Lichner Z, Romaschin AD, Jewett MA, Yousef GM. MicroRNAs in Kidney Disease: An Emerging Understanding. *Am J Kidney Dis* 2012.
93. Sasidharan R, Gerstein M. Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature* 2008;453:729-31.
94. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* 2012.
95. Ghelani HS, Rachchh MA, Gokani RH. MicroRNAs as newer therapeutic targets: A big hope from a tiny player. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3:217-27.
96. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2735-40.
97. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008;29:343-51.
98. Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1183:183-94.
99. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481-6.
100. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, et al. The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* 2009;31:220-31.

101. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem* 2007;282:28929-38.
102. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, et al. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS One* 2012;7:e44789.
103. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 2009;183:2150-8.
104. Tang B, Xiao B, Liu Z, Li N, Zhu ED, Li BS, et al. Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *FEBS Lett* 2010;584:1481-6.
105. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med* 2010;16:49-58.
106. Alsaleh G, Suffert G, Semaan N, Juncker T, Frenzel L, Gottenberg JE, et al. Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2009;182:5088-97.
107. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5282-7.
108. Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM, Tili E, Trotta R, Perrotti D, et al. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of E-micro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 2009;114:1374-82.
109. Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 2009;45:58-69.
110. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009;139:693-706.
111. Sharma A, Kumar M, Aich J, Hariharan M, Brahmachari SK, Agrawal A, et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5761-6.
112. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* 2010;11:141-7.
113. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D. Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7113-8.

114. Dolganiuc A, Petrasek J, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Velayudham A, et al. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1704-10.
115. Tang Y, Banan A, Forsyth CB, Fields JZ, Lau CK, Zhang LJ, et al. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2008;32:355-64.
116. Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199. *J Immunol* 2009;183:5232-43.
117. Bala S, Szabo G. MicroRNA Signature in Alcoholic Liver Disease. *Int J Hepatol* 2012;2012:498232.
118. Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, et al. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol* 2010;12:513-9.
119. Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol Immunol* 2011;8:388-403.
120. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, et al. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology* 2006;31:1574-82.
121. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Dodd PR, Mayfield RD. Altered gene expression profiles in the frontal cortex of cirrhotic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:1460-6.
122. Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, et al. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron* 2008;59:274-87.
123. Tapocik JD, Solomon M, Flanigan M, Meinhardt M, Barbier E, Schank JR, et al. Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *Pharmacogenomics J* 2012.
124. Nunez YO, Mayfield RD. Understanding Alcoholism Through microRNA Signatures in Brains of Human Alcoholics. *Front Genet* 2012;3:43.
125. Kondili LA, Taliani G, Cerga G, Tosti ME, Babameto A, Resuli B. Correlation of alcohol consumption with liver histological features in non-cirrhotic patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:155-9.
126. Kamper-Jorgensen M, Gronbaek M, Tolstrup J, Becker U. Alcohol and cirrhosis: dose-response or threshold effect? *J Hepatol* 2004;41:25-30.

127. Savolainen VT, Liesto K, Mannikko A, Penttila A, Karhunen PJ. Alcohol consumption and alcoholic liver disease: evidence of a threshold level of effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:1112-7.
128. EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2012;57:399-420.
129. Corrao G, Arico S, Lepore R, Valenti M, Torchio P, Galatola G, et al. Amount and duration of alcohol intake as risk factors of symptomatic liver cirrhosis: a case-control study. *J Clin Epidemiol* 1993;46:601-7.
130. Gonzalez Quintela A, Alende R, Aguilera A, Tome S, Gude F, Perez Becerra E, et al. Anticuerpos frente al virus C de la hepatitis en alcohólicos activos. *Rev Clin Esp* 1995;195:367-72.
131. Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, et al. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2002;35:635-8.
132. Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997;25:108-11.
133. Nash SG, McQueen A, Bray JH. Pathways to adolescent alcohol use: family environment, peer influence, and parental expectations. *J Adolesc Health* 2005;37:19-28.
134. Le Bourhis B, Aufrere G. Alcohol exposure pattern and physical dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18 Suppl 1:511-4.
135. Hargreaves GA, Monds L, Gunasekaran N, Dawson B, McGregor IS. Intermittent access to beer promotes binge-like drinking in adolescent but not adult Wistar rats. *Alcohol* 2009;43:305-14.
136. Siegmund S, Vengeliene V, Singer MV, Spanagel R. Influence of age at drinking onset on long-term ethanol self-administration with deprivation and stress phases. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1139-45.
137. Zhang Z, Morse AC, Koob GF, Schulteis G. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:1811-9.
138. Hrubec Z, Omenn GS. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin Exp Res* 1981;5:207-15.
139. Koskinen SM, Ahveninen J, Kujala T, Kaprio J, O'Donnell BF, Osipova D, et al. A longitudinal twin study of effects of adolescent alcohol abuse on the neurophysiology of attention and orienting. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:1339-50.
140. Gurling HM, Murray RM. Genetic influence, brain morphology, and cognitive deficits in alcoholic twins. *Prog Clin Biol Res* 1987;241:71-82.



141. Pares A, Caballeria J, Bruguera M, Torres M, Rodes J. Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage. *J Hepatol* 1986;2:33-42.
142. Schulte MT, Ramo D, Brown SA. Gender differences in factors influencing alcohol use and drinking progression among adolescents. *Clin Psychol Rev* 2009;29:535-47.
143. Vogel FM, AG. *Human Genetics. Problems and approaches*. 3<sup>a</sup> Ed. Berlin: Springer-Verlag. 1996.
144. Luczak SE, Glatt SJ, Wall TL. Meta-analyses of ALDH2 and ADH1B with alcohol dependence in Asians. *Psychol Bull* 2006;132:607-21.
145. Zintzaras E, Stefanidis I, Santos M, Vidal F. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? *Hepatology* 2006;43:352-61.
146. Li D, Zhao H, Gelernter J. Strong association of the alcohol dehydrogenase 1B gene (ADH1B) with alcohol dependence and alcohol-induced medical diseases. *Biol Psychiatry* 2011;70:504-12.
147. Bierut LJ, Goate AM, Breslau N, Johnson EO, Bertelsen S, Fox L, et al. ADH1B is associated with alcohol dependence and alcohol consumption in populations of European and African ancestry. *Mol Psychiatry* 2012;17:445-50.
148. Bhaskar LV, Thangaraj K, Non AL, Singh L, Rao VR. Population-based case-control study of DRD2 gene polymorphisms and alcoholism. *J Addict Dis* 2010;29:475-80.
149. Enoch MA, Zhou Z, Kimura M, Mash DC, Yuan Q, Goldman D. GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naive P and NP rats. *PLoS One* 2012;7:e29369.
150. Roh S, Matsushita S, Hara S, Maesato H, Matsui T, Suzuki G, et al. Role of GABRA2 in moderating subjective responses to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:400-7.
151. Enoch MA, Gorodetsky E, Hodgkinson C, Roy A, Goldman D. Functional genetic variants that increase synaptic serotonin and 5-HT<sub>3</sub> receptor sensitivity predict alcohol and drug dependence. *Mol Psychiatry* 2011;16:1139-46.
152. Zlojutro M, Manz N, Rangaswamy M, Xuei X, Flury-Wetherill L, Koller D, et al. Genome-wide association study of theta band event-related oscillations identifies serotonin receptor gene HTR7 influencing risk of alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011;156B:44-58.
153. Wang TY, Lee SY, Chen SL, Chang YH, Chen SH, Chu CH, et al. Interaction between serotonin transporter and serotonin receptor 1 B genes polymorphisms may be associated with antisocial alcoholism. *Behav Brain Funct* 2012;8:18.

154. Pastor JJ, Laso FJ, Ines S, Marcos M, Gonzalez-Sarmiento R. Genetic association between -93A/G polymorphism in the Fyn kinase gene and alcohol dependence in Spanish men. *Eur Psychiatry* 2009;24:191-4.
155. Karpyak VM, Geske JR, Colby CL, Mrazek DA, Biernacka JM. Genetic variability in the NMDA-dependent AMPA trafficking cascade is associated with alcohol dependence. *Addict Biol* 2012;17:798-806.
156. Setiawan E, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M. Influence of the OPRM1 A118G polymorphism on alcohol-induced euphoria, risk for alcoholism and the clinical efficacy of naltrexone. *Pharmacogenomics* 2012;13:1161-72.
157. Marcos M, Pastor I, de la Calle C, Barrio-Real L, Laso FJ, Gonzalez-Sarmiento R. Cannabinoid receptor 1 gene is associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:267-71.
158. Muschler MA, Heberlein A, Frieling H, Vogel N, Becker CM, Kornhuber J, et al. Brain-derived neurotrophic factor, Val66Met single nucleotide polymorphism is not associated with alcohol dependence. *Psychiatr Genet* 2011;21:53-4.
159. Onori N, Turchi C, Solito G, Gesuita R, Buscemi L, Tagliabracci A. GABRA2 and alcohol use disorders: no evidence of an association in an Italian case-control study. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34:659-68.
160. Munafo MR, Matheson IJ, Flint J. Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry* 2007;12:454-61.
161. Benyamina A, Kebir O, Blecha L, Reynaud M, Krebs MO. CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict Biol* 2011;16:1-6.
162. Toth R, Fiatal S, Petrovski B, McKee M, Adany R. Combined effect of ADH1B RS1229984, RS2066702 and ADH1C RS1693482/ RS698 alleles on alcoholism and chronic liver diseases. *Dis Markers* 2011;31:267-77.
163. Cichoz-Lach H, Partycka J, Nesina I, Celinski K, Slomka M, Wojcierowski J. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene polymorphism in alcohol liver cirrhosis and alcohol chronic pancreatitis among Polish individuals. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:493-8.
164. Garcia-Banuelos J, Panduro A, Gordillo-Bastidas D, Gordillo-Bastidas E, Munoz-Valle JF, Gurrola-Diaz CM, et al. Genetic polymorphisms of genes coding to alcohol-metabolizing enzymes in western Mexicans: association of CYP2E1\*c2/CYP2E1\*5B allele with cirrhosis and liver function. *Alcohol Clin Exp Res* 2012;36:425-31.
165. Vidal F, Lorenzo A, Auguet T, Olona M, Broch M, Gutierrez C, et al. Genetic polymorphisms of ADH2, ADH3, CYP4502E1 Dra-I and Pst-I, and ALDH2 in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2004;41:744-50.

166. Gonzalez-Quintela A, Campos J, Loidi L, Quinteiro C, Perez LF, Gude F. Serum TNF-alpha levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms. *Alcohol* 2008;42:513-8.
167. Ladero JM, Fernandez-Arquero M, Tudela JJ, Agundez JA, Diaz-Rubio M, Benitez J, et al. Single nucleotide polymorphisms and microsatellite alleles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 genes and the risk of advanced chronic alcoholic liver disease. *Liver* 2002;22:245-51.
168. Roy N, Mukhopadhyay I, Das K, Pandit P, Majumder PP, Santra A, et al. Genetic variants of TNFalpha, IL10, IL1beta, CTLA4 and TGFbeta1 modulate the indices of alcohol-induced liver injury in East Indian population. *Gene* 2012;509:178-88.
169. Marcos M, Gomez-Munuera M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. Tumor necrosis factor polymorphisms and alcoholic liver disease: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2009;170:948-56.
170. Laso FJ, Pastor I, Orfao A. [Immune system and alcoholic liver disease]. *Med Clin (Barc)* 2005;125:263-9.
171. Auguet T, Vidal F, Broch M, Olona M, Aguilar C, Morancho B, et al. Polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter and the risk of alcoholism and alcoholic liver disease in Caucasian Spaniard men. *Alcohol* 2010;44:211-6.
172. Lee JJ, Park SK, Kwon OS, Won IS, Kim DK, Jung YK, et al. Genetic polymorphism at codon 10 of the transforming growth factor-beta1 gene in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2011;17:37-43.
173. Marcos M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. Interleukin-10 gene polymorphism is associated with alcoholism but not with alcoholic liver disease. *Alcohol* 2008;43:523-8.
174. Marcos M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. Common polymorphisms in interleukin genes (IL4, IL6, IL8 and IL12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men. *Cytokine* 2009;45:158-61.
175. Tung KH, Huang YS, Yang KC, Perng CL, Lin HC, Lee SD. Serum interleukin-12 levels in alcoholic liver disease. *J Chin Med Assoc* 2010;73:67-71.
176. Tian C, Stokowski RP, Kershenovich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010;42:21-3.
177. Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, et al. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* 2011;53:86-95.
178. Trepo E, Gustot T, Degre D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, et al. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2011;55:906-12.

179. Salzman DW, Weidhaas JB. SNPing cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol Ther* 2012.
180. Srivastava K, Srivastava A. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk. *PLoS One* 2012;7:e50966.
181. Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, Greco C, et al. MicroRNA genetic variations: association with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2013.
182. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, Atabaki M, Bahari G, Jahantigh M, et al. Association of pre-miRNA-146a rs2910164 and premiRNA-499 rs3746444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep* 2012.
183. Preskill C, Weidhaas JB. SNPs in microRNA binding sites as prognostic and predictive cancer biomarkers. *Crit Rev Oncog* 2013;18:327-40.
184. Dreussi E, Biason P, Toffoli G, Cecchin E. miRNA pharmacogenomics: the new frontier for personalized medicine in cancer? *Pharmacogenomics* 2012;13:1635-50.
185. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 2009;183:4733-44.
186. Szabo G, Petrasek J, Bala S. Innate immunity and alcoholic liver disease. *Dig Dis* 2012;30 Suppl 1:55-60.
187. Xu WD, Lu MM, Pan HF, Ye DQ. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* 2012;35:1525-9.
188. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011;48:61-9.
189. Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, et al. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2011;504:9-12.
190. Luo X, Yang W, Ye DQ, Cui H, Zhang Y, Hirankarn N, et al. A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 2011;7:e1002128.
191. Xu W, Xu J, Liu S, Chen B, Wang X, Li Y, et al. Effects of common polymorphisms rs11614913 in miR-196a2 and rs2910164 in miR-146a on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6:e20471.
192. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7269-74.

193. Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010;70:467-72.
194. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med* 2011;15:14-23.
195. De Martino I, Visone R, Fedele M, Petrocca F, Palmieri D, Martinez Hoyos J, et al. Regulation of microRNA expression by HMGA1 proteins. *Oncogene* 2009;28:1432-42.
196. Gazouli M, Papaconstantinou I, Stamatis K, Vaiopoulou A, Zeglinas C, Vassiliou I, et al. Association Study of Genetic Variants in miRNAs in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Preliminary Results. *Dig Dis Sci* 2013.
197. Chu H, Wang M, Shi D, Ma L, Zhang Z, Tong N, et al. Hsa-miR-196a2 Rs11614913 polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from 15 case-control studies. *PLoS One* 2011;6:e18108.
198. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008;118:2600-8.
199. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:5171-80.
200. Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magri I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, et al. KRAS Mutations in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer* 2012.
201. Slattery ML, Wolff RK, Herrick JS, Curtin K, Caan BJ, Samowitz W. Alcohol consumption and rectal tumor mutations and epigenetic changes. *Dis Colon Rectum* 2010;53:1182-9.
202. Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA, Weijnenberg MP. Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K-ras gene. *Alcohol* 2006;38:147-54.
203. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 2008;18:505-16.
204. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:F19-36.
205. Pilarski R, Patel DA, Weitzel J, McVeigh T, Dorairaj JJ, Heneghan HM, et al. The KRAS-variant is associated with risk of developing double primary breast and ovarian cancer. *PLoS One* 2012;7:e37891.
206. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008;68:8535-40.

207. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009;30:1003-7.
208. Johnson C, Francis HL, Glaser S, Han Y, Venter J, Liu C-G, et al. 930 Regulation of Hepatic Stellate Cell Activation by MicroRNA Let-7 Family During Alcoholic Liver Injury. *Gastroenterology* 2012;142:S-935.
209. Repunte-Canonigo V, van der Stap LD, Chen J, Sabino V, Wagner U, Zorrilla EP, et al. Genome-wide gene expression analysis identifies K-ras as a regulator of alcohol intake. *Brain Res* 2010;1339:1-10.
210. Glas J, Seiderer J, Wagner J, Olszak T, Fries C, Tillack C, et al. Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2012;7:e34349.
211. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476:214-9.
212. Varade J, Ramon Lamas J, Rodriguez L, Fernandez-Arquero M, Loza-Santamaria E, Jover JA, et al. IL23R and IL12B genes: susceptibility analysis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1230-2.
213. Zhou L, Yao F, Luan H, Wang Y, Dong X, Zhou W, et al. Functional polymorphisms in the interleukin-12 gene contribute to cancer risk: evidence from a meta-analysis of 18 case-control studies. *Gene* 2012;510:71-7.
214. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
215. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007;27:91-105.
216. Zheng J, Jiang HY, Li J, Tang HC, Zhang XM, Wang XR, et al. MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF-kappaB signalling pathways. *Allergy* 2012;67:362-70.
217. Little FF, de Bie J, van Oosterhout A, Kornfeld H, Center DM, Cruikshank WW. Immunomodulatory effect of interleukin-16 on allergic airway inflammation. *Chest* 2003;123:431S-2S.
218. Lard LR, Roep BO, Toes RE, Huizinga TW. Enhanced concentrations of interleukin 16 are associated with joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004;31:35-9.
219. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Templin J, Cao Y, Keller C, Panse J, et al. Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:1005-20.

220. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, Rotches-Ribalta M, Guillen M, Casas R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95:326-34.
221. Huang H, Zeng Z, Zhang L, Liu R, Li X, Qiang O, et al. The association of interleukin-16 gene polymorphisms with susceptibility of coronary artery disease. *Clin Biochem* 2013;46:241-4.
222. Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 2008;29:1306-11.
223. Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2008;29:579-84.
224. Azimzadeh P, Romani S, Mohebbi SR, Mahmoudi T, Vahedi M, Fatemi SR, et al. Association of polymorphisms in microRNA-binding sites and colorectal cancer in an Iranian population. *Cancer Genet* 2012;205:501-7.
225. Gu XJ, Cui B, Zhao ZF, Chen HY, Li XY, Wang S, et al. Association of the interleukin (IL)-16 gene polymorphisms with Graves' disease. *Clin Immunol* 2008;127:298-302.
226. Do H, Vasilescu A, Carpentier W, Meyer L, Diop G, Hirtzig T, et al. Exhaustive genotyping of the interleukin-1 family genes and associations with AIDS progression in a French cohort. *J Infect Dis* 2006;194:1492-504.
227. Nakki A, Kouhia ST, Saarela J, Harilainen A, Tallroth K, Videman T, et al. Allelic variants of IL1R1 gene associate with severe hand osteoarthritis. *BMC Med Genet* 2010;11:50.
228. Park SW, Kim MK, Kwon KH, Kim J. Association between a promoter polymorphism (rs2192752, -1028A/C) of interleukin 1 receptor, type I (IL1R1) and location of papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Int J Immunogenet* 2012;39:501-7.
229. Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, Gonzalez-Sarmiento R. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and alcoholism in Spanish men. *Alcohol Alcohol* 2005;40:181-6.
230. Gao M, Wang CH, Sima X, Han XM. NFKB1 -94 insertion/deletion ATTG polymorphism contributes to risk of systemic lupus erythematosus. *DNA Cell Biol* 2012;31:611-5.
231. Andersen V, Holst R, Vogel U. Systematic review: diet-gene interactions and the risk of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;37:383-91.
232. Shiels MS, Engels EA, Shi J, Landi MT, Albanes D, Chatterjee N, et al. Genetic variation in innate immunity and inflammation pathways associated with lung cancer risk. *Cancer* 2012;118:5630-6.

233. Marcos M, Pastor I, Gonzalez-Sarmiento R, Laso FJ. A functional polymorphism of the NFKB1 gene increases the risk for alcoholic liver cirrhosis in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1857-62.
234. Reshmi G, Surya R, Jissa VT, Babu PS, Preethi NR, Santhi WS, et al. C-T variant in a miRNA target site of BCL2 is associated with increased risk of human papilloma virus related cervical cancer--an in silico approach. *Genomics* 2011;98:189-93.
235. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 2003;5:R1.
236. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004;2:e363.
237. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D152-7.
238. Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hatta Y, Komata T, Matsushita M, et al. Comparison of statistical power between 2 \* 2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Ann Hum Genet* 2001;65:197-206.
239. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 2004;53:793-808.
240. Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998;19:589-601.
241. Esteban Cardenosa E, de Juan Jimenez I, Palanca Suela S, Chirivella Gonzalez I, Segura Huerta A, Santaballa Beltran A, et al. Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Fam Cancer* 2012;11:629-36.
242. Manna I, Labate A, Mumoli L, Pantusa M, Ferlazzo E, Aguglia U, et al. Relationship between genetic variant in pre-microRNA-146a and genetic predisposition to temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Gene* 2013;516:181-3.
243. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, et al. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:2827-31.
244. Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat* 2010;31:E1052-7.
245. Kjersem JB, Ikdahl T, Guren T, Skovlund E, Sorbye H, Hamfjord J, et al. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin +/- cetuximab. *BMC Cancer* 2012;12:534.



246. Caiola E, Rulli E, Fruscio R, Buda A, Brogginì M, Marabese M. KRas-LCS6 polymorphism does not impact on outcomes in ovarian cancer. *Am J Cancer Res* 2012;2:298-308.
247. Sebio A, Pare L, Paez D, Salazar J, Gonzalez A, Sala N, et al. The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:142-7.
248. Chang JS, Wiemels JL, Chokkalingam AP, Metayer C, Barcellos LF, Hansen HM, et al. Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2152-63.
249. Zhang X, Yang H, Lee JJ, Kim E, Lippman SM, Khuri FR, et al. MicroRNA-related genetic variations as predictors for risk of second primary tumor and/or recurrence in patients with early-stage head and neck cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:2118-23.
250. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361:865-72.
251. Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chronic Dis* 1979;32:51-63.
252. Daly AK. Candidate gene case-control studies. *Pharmacogenomics* 2003;4:127-39.
253. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604.
254. Palmer LJ. *An introduction to genetic epidemiology*. The Policy Press. Bristol. 2011.
255. Willenbring ML. Organic mental disorders associated with heavy drinking and alcohol dependence. *Clin Geriatr Med* 1988;4:869-87.
256. Terry-McElrath YM, O'Malley PM, Johnston LD. Simultaneous alcohol and marijuana use among US high school seniors from 1976 to 2011: Trends, reasons, and situations. *Drug Alcohol Depend* 2013.
257. Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev* 2007;65:S57-63.
258. Hingson RW, Heeren T, Winter MR. Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006;160:739-46.
259. Meier P, Seitz HK. Age, alcohol metabolism and liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:21-6.
260. Lindor KD, Bru C, Jorgensen RA, Rakela J, Bordas JM, Gross JB, et al. The role of ultrasonography and automatic-needle biopsy in outpatient percutaneous liver biopsy. *Hepatology* 1996;23:1079-83.

261. Nezi V, Deutsch M, Gazouli M, Alexopoulou A, Paparrigopoulos T, Liappas IA, et al. Polymorphisms of the CD14 genes are associated with susceptibility to alcoholic liver disease in greek patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2013;37:244-51.
262. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut* 2000;46:540-5.
263. Lavallard VJ, Bonnafous S, Patouraux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, Anty R, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2011;6:e17599.
264. Gaiani S, Gramantieri L, Venturoli N, Piscaglia F, Siringo S, D'Errico A, et al. What is the criterion for differentiating chronic hepatitis from compensated cirrhosis? A prospective study comparing ultrasonography and percutaneous liver biopsy. *J Hepatol* 1997;27:979-85.
265. Kryger P, Schlichting P, Dietrichson O, Juhl E. The accuracy of the clinical diagnosis in acute hepatitis and alcoholic liver disease. Clinical versus morphological diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:691-6.
266. Sanchez GC, Baunsgaard P, Lundborg CJ. A comparison between clinical diagnosis and histopathological findings in liver biopsies. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:985-91.
267. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet* 2005;366:1315-23.
268. Mein CA, Barratt BJ, Dunn MG, Siegmund T, Smith AN, Esposito L, et al. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Res* 2000;10:330-43.
269. Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered* 2002;54:22-33.
270. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 2005;6:847-59.
271. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 2004;12:395-9.
272. Kirk KM, Cardon LR. The impact of genotyping error on haplotype reconstruction and frequency estimation. *Eur J Hum Genet* 2002;10:616-22.
273. Kelley KW, Dantzer R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain Behav Immun* 2011;25 Suppl 1:S13-20.
274. Zahr A, Cook RT, Waldschmidt TJ, Choudhry MA, Kovacs EJ, Bird MD. Alcohol and inflammation and infection: clinical and experimental systems--summary of the 2010 Alcohol and Immunology Research Interest Group Meeting. *Alcohol* 2012;46:147-53.

275. Li C, He H, Zhu M, Zhao S, Li X. Molecular characterisation of porcine miR-155 and its regulatory roles in the TLR3/TLR4 pathways. *Dev Comp Immunol* 2013;39:110-6.
276. Hennessy EJ, Sheedy FJ, Santamaria D, Barbacid M, O'Neill LA. Toll-like receptor-4 (TLR4) down-regulates microRNA-107, increasing macrophage adhesion via cyclin-dependent kinase 6. *J Biol Chem* 2011;286:25531-9.
277. El Gazzar M, Church A, Liu T, McCall CE. MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF-alpha during TLR4-induced gene reprogramming. *J Leukoc Biol* 2011;90:509-19.
278. Bala S, Marcos M, Kodys K, Csak T, Catalano D, Mandrekar P, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:1436-44.
279. Szabo G, Bala S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J Gastroenterol* 2010;16:1321-9.
280. Li J, Li J, Liu X, Qin S, Guan Y, Liu Y, et al. MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-382 is a critical novel gene of alcohol addiction. *EMBO Mol Med* 2013.
281. Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2012;2012:297-306.
282. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-54.
283. Polanska J, Kimmel M. A simple model of linkage disequilibrium and genetic drift in human genomic SNPs: importance of demography and SNP age. *Hum Hered* 2005;60:181-95.
284. Sandovici I, Kassovska-Bratinova S, Vaughan JE, Stewart R, Leppert M, Sapienza C. Human imprinted chromosomal regions are historical hot-spots of recombination. *PLoS Genet* 2006;2:e101.
285. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001;29:229-32.
286. Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2003;4:587-97.
287. Schulze TG, Zhang K, Chen YS, Akula N, Sun F, McMahon FJ. Defining haplotype blocks and tag single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Hum Mol Genet* 2004;13:335-42.
288. Akey J, Jin L, Xiong M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *Eur J Hum Genet* 2001;9:291-300.

289. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2004;74:106-20.
290. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001;29:233-7.
291. Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997;53:1253-61.
292. Iniesta R, Guino E, Moreno V. Analisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005;19:333-41.
293. Kim S, Zhang K, Sun F. Detecting susceptibility genes in case-control studies using set association. *BMC Genet* 2003;4 Suppl 1:S9.
294. Isordia-Salas I, Leanos-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sanchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:365-72.
295. Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, et al. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest* 2004;126:1832-9.
296. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 1998;316:1236-8.
297. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990;1:43-6.
298. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003;37:493-503.
299. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001;29:306-9.
300. Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 2013;126:261-73.
301. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:9184-9.
302. Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem* 2013.
303. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29:1963-6.

304. Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, Hu JK, Harfe BD, McManus MT, et al. The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature* 2005;438:671-4.
305. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, Li YX, Hannah C, Romans AM, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 2008;27:6667-78.
306. Xu J, Hu Z, Xu Z, Gu H, Yi L, Cao H, et al. Functional variant in microRNA-196a2 contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population. *Hum Mutat* 2009;30:1231-6.
307. Guo J, Jin M, Zhang M, Chen K. A genetic variant in miR-196a2 increased digestive system cancer risks: a meta-analysis of 15 case-control studies. *PLoS One* 2012;7:e30585.
308. Li XD, Li ZG, Song XX, Liu CF. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology* 2010;42:669-73.
309. Hu M, Zhao L, Hu S, Yang J. The association between two common polymorphisms in MicroRNAs and hepatocellular carcinoma risk in Asian population. *PLoS One* 2013;8:e57012.
310. Li LJ, Gao LB, Lv ML, Dong W, Su XW, Liang WB, et al. Association between SNPs in pre-miRNA and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem* 2011;44:813-6.
311. Gazouli M, Papaconstantinou I, Stamatis K, Vaiopoulou A, Zeglinas C, Vassiliou I, et al. Association Study of Genetic Variants in miRNAs in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Preliminary Results. *Dig Dis Sci* 2013;58:2324-8.
312. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:119-27.
313. Rosseland CM, Wierod L, Flinder LI, Oksvold MP, Skarpen E, Huitfeldt HS. Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K. *J Cell Physiol* 2008;215:818-26.
314. Okvist A, Johansson S, Kuzmin A, Bazov I, Merino-Martinez R, Ponomarev I, et al. Neuroadaptations in human chronic alcoholics: dysregulation of the NF-kappaB system. *PLoS One* 2007;2:e930.
315. Yang HT, Papoutsopoulou S, Belich M, Brender C, Janzen J, Gantke T, et al. Coordinate regulation of TPL-2 and NF-kappaB signaling in macrophages by NF-kappaB1 p105. *Mol Cell Biol* 2012;32:3438-51.
316. Johnson TP, Tyagi R, Patel K, Schiess N, Calabresi PA, Nath A. Impaired toll-like receptor 8 signaling in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2013;10:74.

317. Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* 2006;7:60.
318. Shrestha R, Millington O, Brewer J, Dev KK, Bushell TJ. Lymphocyte-mediated neuroprotection in in vitro models of excitotoxicity involves astrocytic activation and the inhibition of MAP kinase signalling pathways. *Neuropharmacology* 2013.
319. Yang HY, Kim J, Kim SH, Choe CH, Jang YS. Pro-IL-16 is associated with MHC class II-mediated negative regulation of mouse resting B cell activation through MAP kinases, NF- $\kappa$ B and Skp2-dependent p27kip regulation. *Scand J Immunol* 2013;77:177-86.
320. Tong Z, Li Q, Zhang J, Wei Y, Miao G, Yang X. Association between interleukin 6 and interleukin 16 gene polymorphisms and coronary heart disease risk in a Chinese population. *J Int Med Res* 2013;41:1049-56.
321. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
322. Mercer F, Kozhaya L, Unutmaz D. Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. *PLoS One* 2010;5:e8639.
323. Twomey C, Qian S, McCarthy JV. TRAF6 promotes ubiquitination and regulated intramembrane proteolysis of IL-1R1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:418-23.
324. Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Gentile S, Mantovani A. Decoys and Regulatory "Receptors" of the IL-1/Toll-Like Receptor Superfamily. *Front Immunol* 2013;4:180.
325. Martino D, Holt P, Prescott S. A novel role for interleukin-1 receptor signaling in the developmental regulation of immune responses to endotoxin. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:567-72.
326. Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA, et al. Alcohol-induced IL-1 $\beta$  in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J Leukoc Biol* 2013;94:171-82.
327. Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest* 2012;122:3476-89.
328. Pastor IJ, Laso FJ, Avila JJ, Rodriguez RE, Gonzalez-Sarmiento R. Polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with alcoholism in Spanish men. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1479-82.
329. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:734-44.

330. Durrant DM, Robinette ML, Klein RS. IL-1R1 is required for dendritic cell-mediated T cell reactivation within the CNS during West Nile virus encephalitis. *J Exp Med* 2013;210:503-16.
331. Permeth-Wey J, Chen Z, Tsai YY, Lin HY, Chen YA, Barnholtz-Sloan J, et al. MicroRNA processing and binding site polymorphisms are not replicated in the Ovarian Cancer Association Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:1793-7.
332. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2012;188:454-61.
333. Gantier MP, Stunden HJ, McCoy CE, Behlke MA, Wang D, Kaparakis-Liaskos M, et al. A miR-19 regulon that controls NF-kappaB signaling. *Nucleic Acids Res* 2012;40:8048-58.
334. Harris TH, Wilson EH, Tait ED, Buckley M, Shapira S, Caamano J, et al. NF-kappaB1 contributes to T cell-mediated control of *Toxoplasma gondii* in the CNS. *J Neuroimmunol* 2010;222:19-28.
335. Ascolani A, Balestrieri E, Minutolo A, Mosti S, Spalletta G, Bramanti P, et al. Dysregulated NF-kappaB pathway in peripheral mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Curr Alzheimer Res* 2012;9:128-37.
336. Ridder DA, Schwaninger M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009;158:995-1006.
337. Edenberg HJ, Xuei X, Wetherill LF, Bierut L, Bucholz K, Dick DM, et al. Association of NFKB1, which encodes a subunit of the transcription factor NF-kappaB, with alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 2008;17:963-70.
338. Landi D, Gemignani F, Barale R, Landi S. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA Cell Biol* 2008;27:35-43.





# *ANEXO I*

---



A) Datos de los pacientes alcohólicos incluidos en nuestro estudio. N°: número de identificación del paciente en el estudio. ADN: número de identificación de muestra en la genoteca. Edad: edad del paciente en el momento de recoger la muestra. A/D: tipo de consumo (A = Abuso; D = Dependencia). IL12B, IL16, Mir146a, Mir196a2, IL1R1, NFKB, KRAS: genotipo de cada uno de los polimorfismos.

N°	ADN	Edad	A/D	Cirrosis	IL12B	IL6	Mir146a	Mir196a2	IL1R1	NFKB	KRAS
2	3228	42	D	No	GG	TT	CG	CT	CC	GG	TT
3	3229	32	A	No	TT	CC	GG	CC	CT	GG	TT
4	3230	45	A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
5	3231	48	A	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
6	3242	49	D	No	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
7	3243	39	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
8	3244	56	A	Sí	GT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
9	3245	59	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
10	3246	47	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
11	3247	62	D	Sí	TT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
12	3253	49	D	No	TT	TT	CG	CT	CT	GG	TT
13	3254	56	A	No	TT	TT	CG	TT	CC	GG	GT
14	3255	44	D	No	TT	CT	CG	CT	CT	GG	TT
15	3256	40	D	No	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
16	3257	48	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
17	3280	54	D	No	TT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
19	3282	52	D	No	GT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
20	3283	36	D	No	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
21	3284	66	A	No	GT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
22	3285	63	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
23	3286	44	D	No	GG	TT	GG	CC	CC	GG	TT
24	3295	53	D	No	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
25	3296	38	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
26	3298	50	A	No	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
27	3300	51	D	No	TT	CT	GG	CT	CT	GG	TT
28	3332	41	D	No	GT	TT	GG	CT	CT	GG	TT
29	3333	51	D	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
30	3334	36	A	No	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
31	3335	44	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
32	3337	39	D	No	TT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
33	3338	59	D	No	TT	TT	CC	CT	CT	GG	GT
34	3339	77	A	Sí	TT	CC	GG	TT	CC	GG	GT
35	3340	45	A	No	TT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
37	3346	38	D	No	TT	CC	CC	CT	CC	GG	TT
38	3371	51	D	No	TT	CT	GG	CC	CT	GG	GT
39	3372	61	D	No	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
40	3373	42	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
42	3408	53	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
43	3409	41	D	No	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
44	3411	67	D	Sí	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
45	3487	46	D	No	GT	CT	GG	CT	TT	GG	GT

46	3488	57	D	No	GG	CT	CG	CT	CC	GG	TT
47	3489	33	A	No	TT	CT	CG	TT	CT	GG	TT
48	3490	24	D	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
49	3491	30	A	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	GT
50	3496	45	D	No	GT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
51	3497	55	D	No	TT	TT	GG	CC	CT	GG	GT
52	3609	54	A	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
59	3752	69	A	No	GT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
60	3753	28	A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
65	3785	43	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
66	3816	51	A	No	TT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
67	3817	46	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
68	3843	38	A	No	TT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
71	3871	29	A	No	TT	CT	CC	CC	CC	GG	TT
72	3872	40	A	No	GT	CC	CG	TT	CT	GG	TT
73	3886	64	D	Sí	TT	CT	CC	CT	CC	GG	GT
76	3900	71	D	Sí	TT	TT	CG	CT	CT	GG	TT
77	3901	65	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
78	3911	73	A	Sí	GT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
79	3912	50	D	Sí	TT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
80	3946	67	D	Sí	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
81	3947	61	A	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
82	3948	59	A	No	GT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
83	3968	35	A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
84	3992	71	A	No	GG	TT	GG	TT	CC	GG	TT
85	3993	54	A	Sí	GT	CT	CG	CC	CT	GG	TT
86	3994	56	A	Sí	GT	CC	CC	TT	CC	GG	TT
87	4044	45	D	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
88	4045	35	D	Sí	TT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
89	4087	26	A	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
90	4088	35	A	No	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
91	4116	43	A	Sí	GT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
92	4239	67	A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
93	4240	71	A	No	GT	CT	CG	TT	CT	GG	GT
94	4241	75	A	Sí	GG	TT	GG	CT	CT	GG	TT
95	4242	33	A	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
97	4272	45	A	No	GT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
99	4287	41	D	Sí	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
100	4288	76	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
101	4294	57	D	No	TT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
111	4336	73	A	Sí	TT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
112	4369	27	A	No	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
113	4376	45	D	No	GT	CT	CG	TT	CT	GG	TT
114	4392	46	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
116	4402	57	D	Sí	GT	CT	CG	CT	CT	GG	TT
117	4403	54	D	Sí	TT	TT	CC	TT	CC	GG	TT
118	4404	63	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
119	4405	71	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GG

120	4418	65	A	Sí	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
121	4441	47	D	Sí	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
122	4442	74	D	Sí	GT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
125	4526	68	A	Sí	GT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
126	4602	57	D	Sí	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
127	4603	38	D	Sí	TT	TT	CC	CT	CC	GG	GT
128	4619	52	D	No	GT	CT	GG	TT	CC	GG	GT
129	4647	53	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
130	4661	53	D	No	GT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
131	4673	46	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
132	4703	61	D	No	GT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
133	4714	49	D	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	GT
134	4743	34	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
135	4771	41	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
136	4801	46	A	No	GT	CT	GG	CT	CT	GG	*
137	4828	56	A	No	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
139	4903	52	A	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
140	4922	53	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
141	4936	38	D	No	GT	CT	GG	CT	CT	GG	GT
142	4965	37	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
143	4966	67	D	Sí	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
144	4979	65	A	No	GT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
146	5031	50	D	No	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
147	5038	43	A	No	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
148	5146	56	D	Sí	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
149	5164	62	A	Sí	TT	CT	GG	TT	CT	GG	TT
150	5191	69	D	Sí	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
157	5259	76	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
158	5268	40	D	Sí	TT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
159	5278	41	D	Sí	TT	TT	CC	CC	CT	GG	TT
160	5304	69	D	Sí	GT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
161	5332	73	A	Sí	GT	TT	CG	CT	CC	GG	GG
164	5404	47	D	Sí	TT	CT	GG	TT	CT	GG	TT
165	5412	63	D	Sí	GT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
174	5623	64	A	Sí	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
175	5657	75	A	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
176	5672	57	D	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
177	5691	53	A	Sí	GT	TT	CG	CC	CT	GG	GT
178	5913	37	A	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
194	6018	55	D	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
195	6019	62	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
196	6047	77	A	Sí	TT	CC	GG	CT	CT	GG	TT
206	6094	38	A	Sí	TT	CC	GG	CT	CT	GG	TT
209	6111	31	D	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
210	6116	37	D	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
212	6135	53	D	Sí	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
213	6139	72	A	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
214	6152		A	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GT

215	6156	34	D	Sí	TT	CT	CG	TT	CT	GG	TT
216	6166	49	D	No	TT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
217	6167	60	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
219	6184	49	A	Sí	GT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
220	6195	49	D	No	GT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
221	6205	43	D	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
222	6236	59	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CT	GG	TT
223	6243	59	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
224	6247	73	A	Sí	TT	TT	CC	CT	CC	GG	TT
227	6260	64	D	Sí	GT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
228	6261		D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
229	6272	27	D	No	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
232	6277	44	D	Sí	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
234	6322	65	A	Sí	TT	TT	CG	TT	CC	GG	GT
236	6340	57	D	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
238	6364	76	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CC	AG	TT
241	6459		A	Sí	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
241	6724	67	A	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
243	6775	40	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	GT
244	7128	36	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
245	7217	55	D	No	TT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
246	7218	57	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
247	7574	59	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CT	GG	TT
249	7753	52	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
251	8481	70	A	No	GT	CT	GG	CC	TT	GG	GT
252	8482	65	D	Sí	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
253	8487	45	A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
254	8589	72	A	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
255	8612	73	A	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
256	8795	33	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
257	8796	47	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
258	8833	79	A	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
259	9346	59	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
261	9745	52	A	Sí	GT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
268	10775	45	D	No	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
269	10878	50	D	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
270	10879	44	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
271	10880	42	A	No	TT	TT	CC	CT	CC	GG	TT
272	10881	53	D	No	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
273	11020	28	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GT
274	11021	70	A	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	GT
275	11043	35	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GT
276	11192	71	A	No	TT	TT	CC	CT	CC	GG	TT
277	11212	50	A	Sí	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
278	11264	78	A	No	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
279	11320	44	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
280	11321	38	D	No	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
281	11322	68	D	Sí	TT	TT	GG	CC	CC	GG	GT

282	11326	70	D	No	GT	CC	GG	CT	CC	GG	GT
283	11328	55	D	No	GT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
284	11330	62	A	No	TT	CT	CG	TT	CC	GG	GG
285	11332	58	D	No	GT	CT	CG	TT	CC	GG	TT
286	11339		A	No	GT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
287	11368	44	A	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
288	11377		A	No	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
289	11378	44	D	No	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
290	11406	34	D	No	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
291	11413	59	D	No	GT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
292	11532	58	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
293	11533	45	A	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
294	11565	56	D	No	GT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
295	11572	53	D	No	TT	CC	CC	CC	CC	GG	GT
296	11573	60	D	No	TT	CT	GG	CT	CT	GG	TT
297	11574	38	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
298	11638	55	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CC	GG	GT
299	11658	55	D	No	TT	CT	CG	CC	CT	GG	TT
300	11674		A	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
301	11699	57	D	No	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
302	11712	39	D	No	GT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
303	11713	37	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
304	11742	58	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
305	11791	43	D	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
306	11896	80	A	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
307	11901	54	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
308	11902	52	D	Sí	TT	TT	CG	CC	CC	GG	GT
309	11903	46	D	No	TT	CT	CC	CC	CT	GG	TT
310	11942	48	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
311	11943	53	D	No	GT	CT	GG	CC	CC	AG	TT
312	11984	48	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
313	11987	48	D	No	GT	CC	CG	TT	CC	GG	GT
314	11988	59	D	No	GT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
315	11989	64	D	No	GT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
316	11990	52	D	No	TT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
317	11991	57	D	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
318	12044	31	A	No	TT	CC	GG	TT	CC	GG	TT
319	12045	30	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
320	12047	63	D	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
321	12048	76	D	No	TT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
322	12049	59	D	Sí	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GG
323	12050	59	D	Sí	GT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
324	12051	44	D	No	GT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
325	12124	38	D	No	GT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
326	12125	54	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
327	12169	38	D	No	GT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
328	12170	50	D	No	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
329	12171	52	D	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT

Anexo I

330	12173	50	D	No	GT	CT	GG	TT	CC	GG	GT
331	12174	63	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
332	12213	41	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
333	12214	40	D	No	TT	CT	CG	CC	CT	GG	TT
334	12216	48	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
336	12252	63	D	Sí	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
337	12254	69	D	No	GT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
338	12255	58	D	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
339	12305	64	A	Sí	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
340	12306	35	A	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
341	12307	32	A	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
342	12338	37	D	No	GT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
343	12389	47	D	Sí	GG	CT	GG	CT	CC	GG	TT
344	12442	38	D	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
345	12443	59	A	Sí	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
346	12444	65	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
347	12484	45	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
348	12530	48	A	Sí	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
349	12531	63	A	Sí	TT	CC	CG	TT	CC	GG	TT
350	12532	66	D	Sí	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
351	12604	51	A	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
352	12831	48	A	No	GT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
353	12967	64	D	Sí	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
354	13001	50	D	Sí	TT	CC	GG	TT	CC	GG	TT
355	13105	57	D	No	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
356	13242	54	D	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
357	13243	34	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
358	13244	43	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
359	13690	55	D	Sí	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
360	13870	60	A	No	GG	TT	GG	CC	CC	GG	TT
361	13871		A	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
362	14322		D	No	GT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
363	14723	53	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
364	14789		D	No	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
387	15113	33	D	No	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
403	15405	73	A	Sí	TT	TT	GG	CT	CT	GG	TT
404	15480	36	D	No	TT	CT	CC	TT	CT	GG	TT
410	15712	57	A	Sí	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
412	15780	42	D	No	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
413	15815	36	D	No	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
414	15816	49	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GT
415	15817	50	D	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
416	15849	40	D	No	GT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
417	15850	36	A	No	GT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
418	16137	67	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
419	16460	75	A	Sí	GT	TT	CG	TT	CC	GG	GT
420	16657	78	A	Sí	GT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
421	17583	46	A	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT



422	18147	52	A	No	TT	TT	CG	TT	CC	GG	GT
423	18269	59	D	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
424	18302	46	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
425	18499	51	D	No	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
426	18500	51	A	No	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
427	18501	58	A	No	GT	CC	CC	CT	CC	GG	GT
428	18878	51	D	No	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
429	18879	54	D	No	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
430	18962	39	D	No	GT	TT	CG	CC	CT	GG	TT
431	19352	47	A	No	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
432	19353	43	D	No	TT	TT	CC	CT	CC	GG	TT
433	19534	68	D	No	TT	CC	CG	CT	CC	GG	*
434	19798	68	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
435	19837	61	D	Sí	TT	CT	GG	CC	CT	GG	GT
436	20239	57	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
437	20240	41	D	No	GT	TT	GG	TT	CC	GG	GT
438	20270	61	D	No	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
439	20525	54	D	No	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
440	20526	61	D	No	TT	TT	GG	CC	CC	GG	GT
456	22559	75	D	Sí	*	CT	GG	CT	CC	GG	TT

\* No se logró determinar el genotipo tras procesar en dos ocasiones las muestras.

B) Datos de los controles sanos incluidos en nuestro estudio. N°: número de identificación del paciente en el estudio. ADN: número de identificación de muestra en la genoteca. Edad: edad del paciente en el momento de recoger la muestra. IL12B, IL16, Mir146a, Mir196a2, IL1R1, NFKB, KRAS: genotipo de cada uno de los polimorfismos.

N°	ADN	Edad	IL12B	IL6	Mir146a	Mir196a2	IL1R1	NFKB	KRAS
1	1783	70	TT	TT	GG	CC	CT	GG	GT
18	3281	25	TT	CT	CG	CC	CT	GG	TT
36	3345	33	GT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
41	3374	47	TT	TT	CG	TT	CC	GG	GT
53	3610	75	GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
54	3611	73	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
55	3748	34	TT	TT	GG	CC	CT	GG	GT
56	3749	55	TT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
57	3750	30	TT	CT	GG	CT	CC	AG	TT
58	3751	26	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
61	3781	45	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
62	3782	35	GT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
63	3783	37	TT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
64	3784	29	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
69	3844	27	TT	TT	CC	CC	CC	GG	TT
70	3845	31	TT	CC	GG	TT	CC	GG	TT
74	3887	36	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
75	3888	40	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
96	4243	25	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
98	4284	52	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
102	4318	46	TT	CC	CG	CC	CC	GG	GT
103	4319	24	TT	CC	CG	CC	CC	GG	TT
104	4320	28	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
105	4321	32	TT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
106	4322	27	TT	CC	CG	CC	CT	GG	GT
107	4323	26	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
108	4324	32	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
109	4325	33	GT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
110	4326	41	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GT
115	4401	83	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GG
123	4487	87	GT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
124	4488	27	GT	CC	GG	CT	CC	GG	GT
138	4864	75	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
145	4999	42	TT	CC	CG	CT	CC	GG	TT
151	5213	26	GT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
152	5214	23	GT	CT	GG	CC	CT	GG	TT
153	5215	66	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
154	5251	77	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
155	5252	70	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
156	5253	26	TT	TT	GG	CC	CT	AG	TT

162	5333	74	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
163	5336	88	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
166	5536	73	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
167	5537	60	TT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
168	5583	86	TT	CT	GG	TT	CC	GG	TT
169	5594	32	TT	TT	CC	TT	CC	GG	TT
170	5595	23	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
171	5596	27	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
172	5598	32	TT	CC	GG	CT	CC	AG	TT
173	5599	43	TT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
179	5918	37	TT	TT	GG	CC	CC	GG	GT
180	5919	25	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
181	5920	27	GT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
182	5921	27	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
183	5922	25	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
184	5958	28	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
185	5968	27	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
186	5969	29	GG	TT	GG	CC	CC	GG	TT
187	5971	48	TT	CT	GG	CC	*	GG	TT
188	5972	27	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
189	5976	27	GT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
190	5977	29	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
191	5978	28	GT	TT	CC	CT	CC	GG	GT
192	5981	60	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
193	6004	56	TT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
197	6048	26	TT	CT	GG	CT	CT	GG	TT
198	6053	34	TT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
199	6056	39	GT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
200	6057	36	TT	CT	GG	TT	CC	GG	GT
201	6058	34	GT	TT	GG	CC	CT	GG	TT
202	6059	47	TT	CT	CG	TT	CC	GG	*
203	6060	29	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
204	6071	43	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
205	6078	38	GT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
207	6103	25	GT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
208	6104	23	TT	CT	CG	CT	CT	GG	TT
211	6130	37	TT	CT	GG	CT	CC	GG	GT
218	6176	27	GT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
225	6255	59	TT	TT	GG	CT	CT	GG	TT
226	6256	61	GT	CT	CG	CT	CT	GG	TT
230	6275	31	GT	CT	CG	CC	CC	*	TT
231	6276	25	GT	CT	CG	CT	CT	GG	TT
233	6306	30	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
235	6328	36	GT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
237	6351	42	GT	CC	GG	CT	CC	GG	GT
239	6369	37	TT	CC	CG	CT	CT	GG	GT
240	6370	35	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
248	7670	25	TT	CT	GG	CC	CT	GG	TT

250	7900	24	GG	CC	GG	CT	CC	GG	GT
260	9612	87	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT
262	9746	45	GT	CT	CG	CT	CT	GG	GT
263	9747	60	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
264	9793	32	TT	CT	CG	CC	CC	GG	GT
265	10263	67	GG	TT	GG	CC	CT	GG	TT
266	10309	59	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
267	10619	43	TT	CT	GG	TT	CT	GG	TT
335	12242	27	GT	CT	GG	CT	CT	GG	GT
365	15032	33	GT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
366	15035	59	GT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
367	15036	50	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
368	15037	45	TT	CC	GG	TT	CC	GG	GT
369	15044	55	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
370	15056	61	GT	TT	CG	CT	CT	GG	GT
371	15057	87	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
372	15058	71	TT	CT	GG	CT	CT	GG	TT
373	15059	68	TT	TT	GG	CC	CT	GG	TT
374	15060	80	TT	CT	GG	CC	CC	GG	GT
375	15062	53	TT	TT	CC	CC	CC	GG	GT
376	15063	71	TT	CT	CC	CT	CC	GG	TT
377	15064	62	TT	CT	GG	TT	CT	GG	TT
378	15070	63	TT	CC	GG	CT	CC	GG	GT
379	15074	57	TT	CT	CC	CC	CC	GG	GT
380	15078	52	GG	CT	CC	CT	CC	GG	TT
381	15081	45	TT	CT	GG	CT	CT	GG	TT
382	15097	71	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
383	15098	52	GT	TT	CG	CT	CC	GG	TT
384	15102	28	TT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
385	15104	37	TT	TT	GG	TT	CC	GG	GT
386	15107	22	TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
388	15136	76	TT	CT	CC	CC	CC	GG	TT
389	15137	33	GT	CT	CG	CC	CT	GG	TT
390	15138	43	TT	TT	GG	CC	CT	GG	GT
391	15142	69	TT	CT	CG	CC	CC	GG	TT
392	15144	60	TT	CC	GG	CT	CC	GG	TT
393	15151	72	TT	TT	GG	CT	CT	GG	TT
394	15271	79	TT	TT	GG	TT	CC	GG	TT
395	15274	79	TT	TT	GG	CT	CC	GG	GG
396	15276	40	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
397	15292	80	TT	TT	CG	CT	CC	GG	GT
398	15293	56	TT	TT	GG	CT	CT	GG	TT
399	15314	54	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
400	15329	21	TT	TT	GG	CC	CC	GG	TT
401	15395	64	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
402	15398	32	GT	TT	CG	CC	CC	GG	TT
405	15482	76	TT	CT	CG	CT	CC	GG	TT
406	15483	83	TT	TT	CG	TT	CC	GG	TT

407	15533	81	TT	TT	CC	CT	CC	GG	GT
408	15534	83	TT	TT	CG	CC	CC	GG	GT
409	15711	83	TT	TT	CC	CC	CC	GG	TT
411	15713	67	TT	CC	GG	CC	CC	GG	TT
441	20743	41	TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
442	20825	65	TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
443	20888	47	TT	CT	CG	CT	CC	GG	GT
444	20892	54	GT	CC	GG	CT	CC	GG	GT
445	20964	44	TT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
446	20973		TT	CC	GG	CC	CC	GG	GT
447	21294		TT	TT	GG	CC	CT	GG	TT
448	21336		TT	CT	GG	CT	CC	GG	TT
449	21357		GT	CC	GG	CT	CT	GG	TT
450	21360		GT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
451	21387		TT	CT	GG	CC	CC	GG	TT
452	21471		GT	TT	CG	CC	CC	GG	GT
453	21511		TT	TT	GG	CT	CC	GG	TT
454	22245		*	CT	CG	CC	CC	GG	GT
455	22385		*	CT	GG	CT	CT	GG	TT
457	22648		*	CC	GG	CC	CC	GG	GT

\* No se logró determinar el genotipo tras procesar en dos ocasiones las muestras.



## *ANEXO II*

---

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

Ignacio Novo-Veleiro, Rogelio González-Sarmiento, Clara Cieza-Borrella, Isabel Pastor, Francisco-Javier Laso, Miguel Marcos. A genetic variant in the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to alcohol use disorders. *European Psychiatry*. 2014. [Aceptado el 2 de Febrero de 2014. En prensa].





**A genetic variant in the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to alcohol use disorders**

Ignacio Novo-Veleiro M.D., Rogelio González-Sarmiento M.D., Ph. D., Clara Cieza-Borrella Ph. D., Isabel Pastor M.D., Ph.D., Francisco-Javier Laso\* M.D., Ph.D., Miguel Marcos\* M.D., Ph.D.

\* M Marcos and FJ Laso are both senior authors of this paper

From the Alcoholism Unit, Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca, Spain (IN-V, IP, F-JL, MM), Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca (RG-S, CC, IP, MM) and Institute of Biomedical Research of Salamanca-IBSAL (RG-S, CC, IP, F-JL, MM).

**Corresponding author:** Miguel Marcos. Department of Internal Medicine, University Hospital of Salamanca. Pº San Vicente, 58-156, Salamanca 37007, Spain. Telephone: 00-34-923291100 ext 437. Fax: 00-34-923294739. e-mail: mmarcos@usal.es

**Funding:** This work has been supported by projects PI10/01692 and PI10/00219 (to MM and RG-S, respectively) from the Spanish Ministry of Science and Innovation, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the European Union FEDER funds (“Una manera de hacer Europa”) and by projects GRS 531/A/10 from Junta de Castilla y León, Spain and I3SNS-INT12/049 from ISCIII to MM.

**ABSTRACT:**

**BACKGROUND:** Polymorphisms in the microRNA (miRNA) regulatory pathways are novel functional genetic variants whose association with alcoholism susceptibility has not been previously studied. Given the potential relationship between certain miRNAs and alcohol use disorders (AUDs), this study was designed to explore the association between two polymorphisms within hsa-miR-146a and hsa-miR-196a2 genes (rs2910164 and rs11614913, respectively) and susceptibility to these diseases.

**METHODS:** A total of 301 male patients with alcohol abuse or dependence and 156 sex-matched healthy volunteers were enrolled in this study. Polymorphisms were genotyped using TaqMan<sup>®</sup> PCR assays for allelic discrimination. Allele and genotype frequencies were compared between groups and logistic regression analysis was also performed to analyze the model of inheritance.

**RESULTS:** There was a significantly higher prevalence of allele C carriers (47.8%) of the miR-146a G>C polymorphism (rs2910164) among patients with alcohol abuse or dependence when compared with healthy controls (35.9%), and multivariable logistic regression analysis showed that the C allele (CC and GC genotypes) was associated with these AUDs (OR=1.615, 95%CI 1.067–2.442; *P*=0.023). Neither the genotype nor the allele distribution of miR-196a2 polymorphism (rs11614913) was significantly different between groups.

**CONCLUSIONS:** This is the first genetic association study to explore the relationship of miRNA polymorphisms with AUDs and to show an association of the miR-146a C>G rs2910164 allelic variant with this disease. The role of this miRNA in the Toll-like receptor-4 pathway may explain its association with AUDs.

**KEYWORDS:** genetic polymorphisms, micro RNA, alcoholism.

## **INTRODUCTION:**

Genetic background has an important role in susceptibility to both alcohol use disorders (AUDs) [31] and ethanol-induced organ damage [32]. In this context, genome-wide scans have been performed to identify genes potentially associated with this susceptibility [4, 42] and a large number of association studies have been conducted to elucidate the association between AUDs and specific genetic variants, most of them located on candidate genes involved in addiction and brain reward pathways [19]. While numerous genes have been associated with AUDs vulnerability [19], particularly with alcohol dependence [9, 33], the complete profile of genetic variants underlying the susceptibility to these diseases remains to be fully elucidated.

Polymorphisms in the microRNA (miRNA) regulatory pathway are emerging as a novel class of functional genetic variants yet their potential relationship with AUDs has not been previously studied [27]. Mature miRNAs are small non-coding RNAs which control gene expression through post-transcriptional regulation [12]. Differential expression of specific miRNAs has been found in different diseases, which indicates potential pathogenic roles for these regulatory molecules. Concerning AUDs, recent studies have found differential expression of certain miRNAs in brains of alcoholics [20, 26] and experimental works have shown that miRNAs are able to modulate neuronal alcohol resistance mechanisms [29], brain gene expression during alcohol consumption and withdrawal [8], alcohol-induced up-regulation of dopamine receptor D1 [21] or alcohol-induced neuroinflammation via TLR-4 pathway [22]. The mechanisms underlying such differential expression may involve, at least in part, allelic variants or single nucleotide polymorphisms (SNPs) within miRNA genes [27].

In order to test the hypothesis of an association between miRNA genes and AUDs, we decided to focus on miRNAs potentially related with alcohol-induced

neuroinflammation [2] and alcohol addiction development [1]. Current evidence shows that two putative miRNAs candidates can be hsa-miR-146a gene (C>G rs2910164 polymorphism) and the hsa-miR-196a2 gene (C>T rs11614913) which have been associated with a broad spectrum of inflammatory-related human diseases [41]. Of note, a miRNA array analysis of brains from human alcoholics showed an up-regulation of both miR-146a and miR-196a2 [20]. Considering this finding in light of the known biological functions of these pleiotropic miRNAs (i.e. inflammation and neurotoxicity [25]) a potential association with AUDs emerges.

Thus, the present study was designed to analyze the potential relationships between AUDs and the rs2910164 polymorphism within the miR-146 gene and/or the rs11614913 polymorphism within the miR-196a2 gene.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patients and controls*

A total of 301 male patients with AUDs from the Alcoholism Unit of the University Hospital of Salamanca (Spain) were enrolled in this study. The average age of these patients was 52.2 years (standard deviation [SD] = 14.4) and they had consumed more than 100 g of ethanol daily for at least 10 years. Of them, 189 had alcoholic dependence (AD) and 112 had alcohol abuse (AA), according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV) criteria [3]. DSM-IV criteria were implemented systematically to the study participants through the use of semi-structured interviews conducted by trained staff members with expertise in the treatment of alcoholic patients. The diagnosis of alcoholic dependence or alcohol abuse was clinically established and the Systematic Interview of Alcohol

Consumption (SIAC) was used to quantify alcohol consumption [14]. All subjects also underwent a comprehensive psychiatric examination and patients with addictions to other drugs (apart from nicotine) or with major Axis I disorders (i.e. schizophrenia, mood disorders, or major anxiety disorders) were not included in the study.

A control group was composed of 156 male healthy volunteers with mean age of 46.7 years (SD = 19.5). All of them consumed less than 10 g of ethanol per day and none had a history of alcohol abuse or alcohol dependence and neither did their first or second-degree relatives.

All patients and control subjects were interviewed to ascertain that they were at least third-generation born in Castilla-León (northwestern Spain) and they provided informed consent for study participation. The study was carried out with the approval from the Ethics Committee of the University Hospital of Salamanca.

#### *Genetic analysis*

Genomic DNA was extracted from nucleated peripheral blood cells using standard proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA concentration was measured using a spectrophotometer (GeneQuant, Pharmacia) and samples were stored at -20°C until use. Samples from controls and patients with AD and AA were mixed on PCR plates to ensure simultaneous detection and analysis in a blinded fashion. The rs2910164 and rs11614913 polymorphisms were genotyped using TaqMan genotyping assays (Cat. #4351379 and # 4351379, respectively) with the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. A reaction solution of 10 µL was prepared containing 0.25 µL TaqMan Genotyping Assay probe (consisting of 20X Mix of unlabeled PCR primers and TaqMan minor groove binder probe, 6-carboxyfluorescein

and VIC dye-labeled), 5  $\mu$ L of TaqMan Universal PCR Master Mix reagent, 4,25  $\mu$ L of ddH<sub>2</sub>O and 0,5  $\mu$ L of genomic DNA. The PCR consisted of pre-PCR read at 60 °C for 30 s, holding stage at 95 °C for 10 min, 40 cycles of denaturing at 95 °C for 15 s, annealing 60 °C for 1 min 30 s and post-PCR read at 60 °C for 30 s.

### *Statistical Analysis*

Differences in allele and genotype frequencies between groups were compared by means of the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test, as appropriate (expected frequency value < 5) and linear trend test. Deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium in genotype frequencies among healthy controls was assessed by the  $\chi^2$  test. A *P*-value < 0.05 was regarded as significant.

Patients with AUDs were compared with controls and statistical comparisons were also performed between AA and AD subgroups. The independent contributions of genetic markers to the phenotype were further tested using logistic analysis in order to evaluate recessive versus dominant inheritance of specific alleles. Considering the analysis of the miR-146a C>G polymorphism, arbitrary effects for heterozygous individuals were included in the general model, and the three possible genotypes (CC, CG, and GG) were denoted by three dummy variables (0, 1, and 2). The dominant model was based on the hypothesis that GC and CC genotypes contributed equally to the risk of AUDs development, and genotypes were coded as follows: GG = 0 and GC and CC = 1. The recessive model was based on the hypothesis that only the CC genotype contributed to the risk of AUDs, and the genotypes were coded as follows: GC and GG = 0 and CC = 1. Akaike's information criterion (AIC), which combines the goodness of fit with the number of parameters, was used to select the best model. The model with the lowest AIC value was considered to have the best fit [30]. Strength of association was calculated with odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI). A

*P*-value < 0.05 was regarded as significant. All these analyses were performed using SPSS v. 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

The statistical power of this study to detect a polymorphism conferring an OR of 2 for the presence of AUDs was calculated by the **PS: Power and Simple Size Calculations** software, version **3.0.43** (available at <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>) [11].

Assuming  $\alpha$  of 0.05 and prevalence of the less frequent allele among controls of 0.2, the statistical power was 85.8% for the total study population (subjects with AUDs, n=301; healthy controls, n=156). Regarding the comparison of patients with alcohol dependence (n = 189) versus patients with alcohol abuse (n = 112), the statistical power was 70,7% under the same conditions.

## RESULTS

The genotype distributions of both polymorphisms among subjects with AUDs and healthy controls are shown in Table 1. Healthy controls showed genotype distributions similar to those previously reported among healthy Caucasian populations [5, 6, 23] and no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found.

The genotype distribution of the miR-196a2 polymorphism showed no significant differences between groups (subjects with AUDs vs. healthy controls or patients with AD vs. AA). In contrast, the genotype distribution of miR-146a polymorphism showed significant differences between subjects with AUDs and healthy controls ( $P=0.049$ ,  $\chi^2$  test and  $P=0.034$ , linear trend test). Allele analysis of this polymorphism showed that the proportion of allele C carriers was significantly higher in subjects with alcohol use disorder (47.8%) than in controls (35.9%) ( $P=0.015$ ).



However, no differences were found regarding genotype or allele distribution of miR-146a gene polymorphism when comparing patients with AD versus those with AA.

The results of multivariable logistic regression analyses of the relationship between miR-146a polymorphism and AUDs are presented in Table 2. After adjustment for age, allele C carriers (CC and GC genotype) showed an OR of 1.615 (95% CI 1.067 – 2.442;  $P=0.023$ ) for the presence of alcohol use disorder. According to the AIC scores, the dominant model for the C allele of this polymorphism was the most parsimonious model of inheritance.

## **DISCUSSION**

Our results show an association between the miR-146a C>G (rs2910164) polymorphism and AUDs, defined as alcohol abuse or dependence according to DSM-IV criteria. Specifically, the possession of the C allele of this genetic variant (GC or CC genotype) was associated with a higher risk of AUDs when compared with the GG genotype. In contrast, the miR-196a2 C>T (rs11614913) polymorphism showed no association to this disease. To the best of our knowledge, this is the first published study showing an association of a miRNA allelic variant with alcohol abuse or dependence.

In order to explain the potential relevance of our novel finding, we first considered the role of miR-146a in the Toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling pathway. This is of interest because ethanol intake is known to activate the TLR-4 pathway on macrophages through endotoxin-CD14 interaction, which has a key role in ethanol induced-organ damage. Activation of the TLR-4 pathway induces the secretion of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  and these cytokines have been shown to stimulate miR-146a expression. This miRNA,

in turn, down-regulates other inflammatory-related genes within the TLR-4 pathway, such as the IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1, IRAK-2 or TNF receptor-associated factor (TRAF)-6 genes [15, 35, 43]. Therefore, miRNA-146a has been characterized as an inhibitor of the TLR-4 inflammatory pathway acting through a negative feedback mechanism.

Different studies have shown the importance of neuroinflammation on addictive behavior development [7]. Regarding alcohol dependence, TLR-4 activation has been implicated as a contributing factor to ethanol-induced neuroinflammation [10, 24], which could be associated with alcohol abuse and dependence [18]. Indeed, the involvement of TLR-4 in alcoholism is clear since knockdown of TLR-4 gene prevented alcohol-induced neuroinflammation in mice [2], reinforcing the idea of the relevance of this pathway in this disease [13, 37].

The role of miRNAs in the development of alcohol dependence has been recently proposed [28, 36] and overexpression of specific miRNAs has been linked to this disease [21, 26]. The direct implication of miR-146a in this disease has not been previously studied, but in spite of the lack of direct evidence of the role of miR-146a in alcohol-induced neuroinflammation, it seems plausible that this miRNA is also involved in TLR-4 signaling in this setting. The findings from a recent study of miR-146a activity in the nervous system support this theory, as this miRNA was shown to reduce the secretion of inflammatory cytokines from glial cells (e.g. astrocytes) via TLR-4 pathway [16].

The potential relationship of miR-146a with ethanol-induced neuroinflammation seems therefore possible considering this data. It is more difficult, however, to establish the exact role of miR-146a C>G polymorphism in AUDs. A direct functional effect of

this polymorphism has been suggested by an association study in cancer showing that the C allele of this SNP reduced the amount of pre- and mature miR-146a and decreased inhibition of target genes (IRAK-1 and TRAF-6) when compared with the G allele [17]; similar results have been found in other studies focused on cancer [39, 40]. In regard to AUDs, we can therefore hypothesize that the presence of the C allele of this polymorphism may cause lower levels of miR-146a, which would promote alcohol-induced neuroinflammation through disruption of the normal regulatory process of the TLR-4 inflammatory pathway. Such an effect could, in turn, induce a higher risk of developing AUDs, thus explaining the higher frequency of the C allele found in the subjects with AUDs of our study population as compared to healthy controls.

This hypothesis, however, does not explain the increased levels of miR-146a expression present in brains from alcoholics [20] nor other conflicting functional data previously reported showing that the C allele was associated with higher levels of miR-146a [34]. These discrepancies may be due to the pleiotropic effects of miR-146a, limitations of *in vitro* studies, and/or changes in miR-146 expression with acute or chronic alcohol intake. Furthermore, the exact relationship of alcohol induced-neuroinflammation with AD or AA remains unclear. In any case, we believe that the finding of an association between miR-146a G>C polymorphism and AUDs reflects the involvement of this allelic variant in this disease and further studies are warranted to determine the extent of this association.

Although the current study found no evidence of an association between the miR-196a2 rs11614913 polymorphism and AUDs, this could be due to a low statistical power to detect a minor effect of this miRNA on this disease. Indeed, previous studies have demonstrated an association between this particular polymorphism and other

diseases, such as cancer [38] but little information is available about the association of this allelic variant with inflammatory diseases and with AUDs in particular.

In our work, we have controlled several potential confounders that could affect the validity of our results like addiction to other drugs, major psychiatric disorders, sex and age, although our results can thus only be extrapolated to male subjects. We have to acknowledge, however, several potential limitations. First, the lack of use of structured interviews for the diagnosis of alcohol abuse and dependence and for establishing alcohol consumption, could potentially lead to selection or classification bias. The absence of data regarding family history of alcoholism among cases could be a potential limitation, since it is a known predisposing factor to the development of AUDs. Further, the possibility of a type I error remains an important concern in genetic studies, particularly when multiple tests are performed. Therefore, given the statistical significance achieved in our analysis, our results should be interpreted with caution until they are independently replicated. Finally, although all our patients had an alcohol use disorder, it is true that the presence of a mixed phenotype (patients with AA or AD) in candidate gene association studies may be a confounding factor, particularly because the genetic basis of AA is less clear than that of AD.

## **CONCLUSIONS**

In summary, the genetic association study described herein represents the first of its kind to analyze miRNA polymorphisms in AUDs and to show an association of the miR-146a C>G rs2910164 allelic variant with these diseases. Our findings highlight the potential relevance of polymorphisms within miRNA genes as useful markers to explain

the susceptibility to complex trait diseases and justify further investigations into the role of miRNAs in alcohol-induced inflammatory response.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Ms. Nieves Mateos and Ms. Pilar Rodríguez for their technical assistance.

REFERENCES

1. Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:19-47.
2. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 2010;30:8285-95.
3. APA. *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*. American Psychiatric Association. 4th Ed, text revised. Washington 2000.
4. Biernacka JM, Geske JR, Schneekloth TD, Frye MA, Cunningham JM, Choi DS, et al. Replication of genome wide association studies of alcohol dependence: support for association with variation in ADH1C. *PLoS One* 2013;8:e58798.
5. Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat* 2010;31:E1052-7.
6. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 2010;77:411-3.
7. Clark KH, Wiley CA, Bradberry CW. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox Res* 2013;23:174-88.
8. Contet C. Gene Expression Under the Influence: Transcriptional Profiling of Ethanol in the Brain. *Curr Psychopharmacol* 2012;1:301-14.
9. Crabbe JC, Phillips TJ, Harris RA, Arends MA, Koob GF. Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. *Addict Biol* 2006;11:195-269.
10. Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 2011;25 Suppl 1:S4-S12.
11. Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations for studies involving linear regression. *Control Clin Trials* 1998;19:589-601.
12. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861-74.
13. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 2009;183:4733-44.
14. Gual A, Contel M, Segura L, Ribas A, Colom J. [The ISCA (Systematic Interview of Alcohol Consumption), a new instrument to detect risky drinking]. *Med Clin (Barc)* 2001;117:685-9.
15. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F, An H, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 2009;183:2150-8.
16. Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, et al. MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS One* 2012;7:e44789.
17. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7269-74.
18. Kelley KW, Dantzer R. Alcoholism and inflammation: neuroimmunology of behavioral and mood disorders. *Brain Behav Immun* 2011;25 Suppl 1:S13-20.

19. Kohnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol* 2008;75:160-77.
20. Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD. Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:1928-37.
21. Li J, Li J, Liu X, Qin S, Guan Y, Liu Y, et al. MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-382 is a critical novel gene of alcohol addiction. *EMBO Mol Med* 2013;5:1402-14.
22. Lippai D, Bala S, Csak T, Kurt-Jones EA, Szabo G. Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PLoS One* 2013;8:e70945.
23. Lofgren SE, Frostegard J, Truedsson L, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Witte T, et al. Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun* 2012;13:268-74.
24. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S232-40.
25. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem* 2008;283:31315-22.
26. Manzardo AM, Gunewardena S, Butler MG. Over-expression of the miRNA cluster at chromosome 14q32 in the alcoholic brain correlates with suppression of predicted target mRNA required for oligodendrocyte proliferation. *Gene* 2013;526:356-63.
27. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009;10:399-416.
28. Nunez YO, Truitt JM, Gorini G, Ponomareva ON, Blednov YA, Harris RA, et al. Positively correlated miRNA-mRNA regulatory networks in mouse frontal cortex during early stages of alcohol dependence. *BMC Genomics* 2013;14:725.
29. Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, et al. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron* 2008;59:274-87.
30. Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 2004;53:793-808.
31. Prescott CA, Kendler KS. Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *Am J Psychiatry* 1999;156:34-40.
32. Reed T, Page WF, Viken RJ, Christian JC. Genetic predisposition to organ-specific endpoints of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1528-33.
33. Samochowiec J, Kucharska-Mazur J, Grzywacz A, Jablonski M, Rommelspacher H, Samochowiec A, et al. Family-based and case-control study of DRD2, DAT, 5HTT, COMT genes polymorphisms in alcohol dependence. *Neurosci Lett* 2006;410:1-5.
34. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29:1963-6.
35. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12481-6.

36. Tapocik JD, Solomon M, Flanigan M, Meinhardt M, Barbier E, Schank JR, et al. Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *Pharmacogenomics J* 2013;13:286-96.
37. Valles SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 2004;14:365-71.
38. Wang J, Wang Q, Liu H, Shao N, Tan B, Zhang G, et al. The association of miR-146a rs2910164 and miR-196a2 rs11614913 polymorphisms with cancer risk: a meta-analysis of 32 studies. *Mutagenesis* 2012;27:779-88.
39. Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010;70:467-72.
40. Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008;29:2126-31.
41. Xu W, Xu J, Liu S, Chen B, Wang X, Li Y, et al. Effects of common polymorphisms rs11614913 in miR-196a2 and rs2910164 in miR-146a on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6:e20471.
42. Yan J, Aliev F, Webb BT, Kendler KS, Williamson VS, Edenberg HJ, et al. Using genetic information from candidate gene and genome-wide association studies in risk prediction for alcohol dependence. *Addict Biol* 2013.
43. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, Taganov KD, O'Connell RM, Baltimore D. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:9184-9.



**Table 1.** Comparison of genotype and allele frequencies of miR-146a and miR-196a2 gene polymorphisms in patients with alcohol use disorders and controls.

		AUDs vs controls			AD vs AA		
		AUDs	Controls	<i>P</i>	AD	AA	<i>P</i>
miR-146a	GG	157 (52.2)	100	0.049	101 (53.4)	56 (50)	0.846
rs2910164			(64.1)				
	GC	121 (40.1)	46 (29.5)		74 (39.2)	47 (42)	
	CC	23 (7.7)	10 (6.4)		14 (7.4)	9 (8)	
	GC + CC	144 (47.8)	56 (35.9)	0.015*	88 (46.7)	56 (50)	0.564
miR-196a2	CC	117 (38.9)	58 (37.2)	0.234	77 (40.7)	40 (35.7)	0.235
rs11614913	CT	136 (45.2)	81 (51.9)		87 (46)	49 (43.8)	
	TT	48 (15.9)	17 (10.9)		25 (13.3)	23 (20.5)	
	CT + TT	184 (61.1)	98 (62.8)	0.724	112 (59.3)	72 (64.3)	0.387

Data are presented as absolute frequencies (%). AUDs: patients with alcohol use disorders. AD: alcoholics with alcohol dependence. AA: alcoholics with alcohol abuse.

\* The presence of the C allele of miR-146 polymorphism showed a significantly different distribution in patients with AUDs compared to controls ( $p = 0.015$ ).

**Table 2.** Genotype frequencies of the G>C miR-146 polymorphism by disease status and logistic regression analysis in patients with alcohol use disorders.

Model	Patients with AUDs	Controls	Multivariable analysis		
			OR	95% CI	P
<b>General</b>					
CC	23 (7.7)	10 (6.4)	1	Reference	
GC	121 (40.1)	46 (29.5)	1.242	0.541 – 2.852	0.609
GG	157 (52.2)	100 (64.1)	0.741	0.334 – 1.645	0.461
<b>Recessive</b>					
CC	23 (7.7)	10 (6.4)	1	Reference	
GG + GC	278 (92.3)	146 (93.6)	0.901	0.413 – 1.967	0.794
<b>Dominant</b>					
GG	157 (52.2)	100 (64.1)	1	Reference	
GC + CC	144 (47.8)	56 (35.9)	1.615	1.067– 2.442	0.023

Data are presented as absolute frequencies (%).

AUDs= alcohol use disorders. OR = odds ratio. CI = confidence interval.