

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SISTEMA
DOPAMINÉRGICO, GABA, BDNF Y NPY Y SU
RELACIÓN CON LA DEPENDENCIA
ALCOHÓLICA

Sandra Patricia Gómez Lesmes

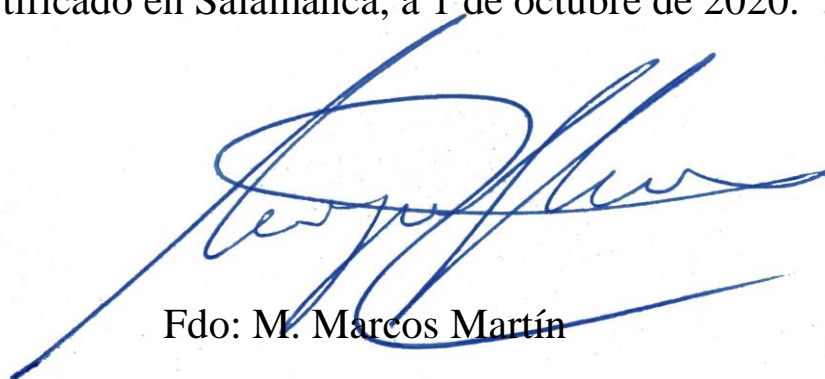
2020

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

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Polimorfismos genéticos del sistema dopaminérgico, GABA, BDNF y NPY y su relación con la dependencia alcohólica”** que presenta Dña. Sandra Patricia Gómez Lesmes, 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, expide el presente certificado en Salamanca, a 1 de octubre de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Marcos Martín', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Fdo: M. Marcos Martín

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Miguel Marcos, mi director de tesis y mentor, quien ha compartido conmigo sus conocimientos. Gracias a su guía durante la elaboración de este trabajo, consejos, aportes y profundo apoyo, contribuyó a la culminación del mismo y a mi formación profesional. Agradezco su cercanía, continua motivación y el estar siempre presto para resolver cualquier duda. Me siento honrada de haber recibido sus enseñanzas.

A la doctora Isabel Pastor por haberme motivado y confiado la realización del presente trabajo. Siempre recuerdo su ejemplar forma de trabajar.

A los doctores Hernán Llorente e Ignacio Novo por la amabilidad, disponibilidad y todo el soporte profesional que me brindaron en los inicios de este proyecto en el laboratorio.

A todos los profesionales del laboratorio de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, que me ayudaron en el aprendizaje de las técnicas moleculares para poder realizar éste trabajo y me facilitaron los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas para la realización de esta tesis.

A los pacientes que permitieron el análisis de su sangre para contribuir en el avance de la ciencia. Me han ayudado a reafirmar mi compromiso hacia ellos y le dieron un profundo sentido al presente trabajo.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo a Dios. A mi preciosa familia, Edwing, mi amado esposo, así como a mis hijos Sophie y Emmanuel, por inspirarme y por haberme permitido tomar parte de su valioso tiempo para poder realizar este trabajo; a mis padres, hermana y tíos, quienes me han motivado continuamente para culminar esta meta desde la distancia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	V
INTRODUCCIÓN	2
BREVE RESEÑA HISTÓRICA	3
EPIDEMIOLOGÍA DEL CONSUMO DEL ALCOHOL.....	5
EL ALCOHOLISMO Y LOS PATRONES DE CONSUMO.....	8
CUESTIONARIOS DE VALORACIÓN DEL CONSUMO DE RIESGO	16
FACTORES DE VULNERABILIDAD PARA EL CONSUMO	19
EFECTOS DEL ALCOHOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	21
BASES NEUROBIOLÓGICAS DEL ALCOHOLISMO.....	25
EL ALCOHOL Y LAS VÍAS DE NEUROTRANSMISIÓN	31
El Factor Neurotrófico derivado del Cerebro (BDNF).....	31
El neuropéptido Y (NPY)	33
El sistema gabaérgico	34
El sistema glutamatérgico	36
El sistema dopaminérgico	38
El sistema opioide	41
El Sistema endocanabinoide	42
El sistema serotoninérgico	44
El sistema noradrenérgico.....	46
La corticotropina	46
FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON EL CONSUMO DE ALCOHOL.....	47
Estudios de asociación genómica ampliada.....	48
Análisis de ligamiento	49

POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y DEPENDENCIA ALCOHÓLICA	51
Polimorfismos del gen que codifica para el BDNF	51
Polimorfismos del gen que codifica el NPY	52
Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores GABA-A (GABRA):	53
Polimorfismos de los receptores dopaminérgicos (DRD)	58
Polimorfismos del gen de la cinasa ankirina 1 (<i>ANKK1, ankyrin repeat and kinase-containing 1</i>).	62
OBJETIVOS	66
MATERIAL Y MÉTODOS	71
PACIENTES	73
EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DEL ADN	73
Obtención de células mononucleadas de sangre periférica	73
Aislamiento del ADN total de alto peso molecular	74
Purificación del ADN	74
Amplificación del ADN	75
POLIMORFISMOS ESTUDIADOS	78
Polimorfismos del gen que codifica para el Factor neurotrópico derivado del cerebro (<i>BDNF</i>)	78
Polimorfismos del gen del Neuropeptido Y (<i>NPY</i>)	79
Polimorfismos de los genes de los receptores del sistema del ácido gama amino butírico A subunidad alfa (<i>GABRA</i>)	81
<i>GABRA 1</i>	81
<i>GABRA 2</i> :	82
<i>GABRA 6</i>	84
Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores de dopamina (DRD)	86
<i>DRD1</i>	86

<i>DRD2</i> y <i>ANKK1</i>	87
<i>DRD3</i>	88
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	89
Análisis estadístico de cada polimorfismo	89
Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento	91
Cálculo de la potencia estadística	92
RESULTADOS	94
RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ESTUDIADOS EN NUESTRO TRABAJO ...	96
Polimorfismos del <i>BDNF</i>	96
Polimorfismo rs6265	96
Polimorfismo rs28383487	100
Polimorfismos del <i>NPY</i>	101
Polimorfismo rs16139	101
Polimorfismo rs9785023 (rs5573) 1258 G>A.....	102
Polimorfismos del gen de los receptores GABA (<i>GABRA</i>).....	105
Polimorfismos del gen <i>GABRA 1</i>	105
Polimorfismo rs1037715	105
Polimorfismo rs2279020	107
Polimorfismos del gen <i>GABRA2</i>	111
Polimorfismo rs279858	111
Polimorfismo rs168697	112
Polimorfismo rs9291283	113
Polimorfismo rs894269	115
Polimorfismos del gen <i>GABRA6</i>	121
Polimorfismo rs2197414	121

Polimorfismo rs1992647	122
Polimorfismo rs3219151	124
Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores de dopamina (<i>DRD</i>)	132
Polimorfismos del gen <i>DRD1</i> :.....	132
Polimorfismo rs4867798	132
Polimorfismos de los genes <i>DRD2</i> y <i>ANKK1</i> :	134
Polimorfismo rs6277	134
Polimorfismo rs1799978	135
Polimorfismo rs1800497 (<i>LYS 713 GLU</i>).....	136
Polimorfismo del gen <i>DRD3</i> :	141
Polimorfismo rs6280	141
DISCUSIÓN.....	144
Polimorfismo del gen <i>BDNF</i>	148
Polimorfismos del gen del <i>NPY</i>	153
Análisis de haplotipos del <i>NPY</i>	157
Variantes genéticas del receptor del GABA-A (<i>GABRA</i>).....	157
Polimorfismos del <i>GABRA1</i>	157
Análisis de los haplotipos del gen <i>GABRA1</i>	159
Polimorfismos del <i>GABRA2</i>	160
Análisis de los haplotipos del <i>GABRA2</i>	164
Polimorfismos del gen <i>GABRA 6</i>	167
Estudio de haplotipos del gen <i>GABRA6</i>	169
Variantes genéticas del sistema dopaminérgico.....	170
Polimorfismo del gen del receptor de la dopamina <i>D1 (DRD1)</i>	170

Polimorfismos del Gen del receptor de la dopamina D2 (<i>DRD2</i>) y de la de la cinasa ankirina 1 (<i>ANKK1</i>)	170
Análisis de los haplotipos del gen <i>DRD2</i> y <i>ANKK1</i>	175
Polimorfismo del gen <i>DRD3</i>	178
LIMITACIONES GENERALES DE NUESTRO ESTUDIO	180
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA.....	186

INTRODUCCIÓN

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

El consumo de alcohol es una práctica tan antigua como casi la misma humanidad. Desde tiempos remotos ha sido la forma de celebrar importantes acontecimientos y eventos sociales. El origen de la palabra alcohol no es claro. En el árabe la palabra antigua *alcoholeé*, donde “al” quiere decir "el" y "*kohol*" significa "sutil", hacía referencia a espíritus malignos dado los efectos que este producía en las personas.(1) Otra palabra en el árabe que reclama su origen es *alkohl*, el cual resultaba de mezclar pinturas y polvos de contenido mineral para el maquillaje de las mujeres de la alta sociedad.(2)

Hay señales del uso de bebidas alcohólicas desde la prehistoria como fruto de la fermentación de jugos y granos; sin embargo, las evidencias arqueológicas actuales datan la producción de vino entre los periodos del 6000 al 5000 a. C, en regiones que abarcan Georgia e Irán.(3,4)

El alcohol y sus consecuencias por el consumo excesivo se mencionan en la Biblia y en otros escritos religiosos. La borrachera más antigua conocida se relata en la historia de Noé quien al bajar del arca plantó una viña, obtuvo vino, lo bebió y terminó echado en su tienda y desnudo, lo que posteriormente trajo una grave consecuencia en su familia y descendencia. Los griegos veneraban a Dionisio como el dios que inventó el vino y que proporcionaba alegría a los mortales en un intento de disipar sus penas. Los egipcios creían que el conocimiento del vino había sido concedido por Osiris.

Tanto en Oriente como en Occidente y en la antigua Roma y Grecia era una bebida muy apreciada y se utilizaba en la mayoría de celebraciones. Los alquimistas de

Europa en la edad media utilizaban el alcohol para obtener esencias por destilación. En el mundo cristiano, la obtención del alcohol a partir de la destilación, se atribuye a Italia, en Salerno, hacia el 1100, aunque anteriormente ya se había descrito en otras zonas. En la región vinícola mediterránea de la península ibérica, aparecieron los primeros textos alquímicos donde se describe el proceso árabe de destilación. El primer texto que explica la técnica de destilación se le atribuye a Ramón Llull (1233-1315), sin embargo, tuvo escasa difusión debido a la censura de la inquisición y la bula condenatoria del Papa Gregorio XI.(2) En medicina se utilizaba como desinfectante, como analgésico, como antipirético e incluso para la acidez estomacal.

Con el comienzo de la reforma de Martín Lutero en el siglo XVI se empiezan a cuestionar los beneficios de la ingesta del alcohol, llegando a catalogarse como una bebida diabólica. Sin embargo, los puritanos que llegaron a América en 1620, fueron los que introdujeron la práctica de beber alcohol. Con la llegada a Europa en el siglo XVI de bebidas como el café, una alternativa calórica y de bienestar frente al alcohol, comienza el descenso del consumo del mismo, sobre todo en las clases altas donde no beber con moderación comenzaba a verse con malos ojos. No así en las clases bajas donde el consumo sin medida era una forma de expresar alegría y una forma de olvidar la desdicha de sus propias vidas. En este sentido podemos mencionar la “locura de la ginebra” o *gin craze*, que generó auténticas epidemias de embriaguez en Londres.(5)

Las bebidas alcohólicas también fueron analizadas desde un punto de vista científico durante este periodo. Estudios cuantitativos sobre la fermentación alcohólica y el descubrimiento del ácido acético fueron realizados por Lavoisier en 1789.(6) Louis Pasteur encontró que la levadura era la encargada de iniciar toda la reacción

fisicoquímica conocida como fermentación a partir de azúcares, y que culmina en la producción de alcohol.(2)

En la era moderna comenzaron a surgir organizaciones que promulgan por la abstinencia del consumo de alcohol. En el siglo XIX en Estados Unidos, surgieron las primeras organizaciones anti-alcohol. Posteriormente y en el mismo siglo, surgieron las de en Europa, siendo las más conocidas las de Gran Bretaña y los países escandinavos. En 1920, Estados Unidos creó una ley que declaró ilegal la producción, comercio y consumo de alcohol. Este período, que duró trece años, fue conocido mundialmente como “Ley Seca”.(7) En la mayoría de países actualmente incluyendo España, la venta de alcohol está prohibida a los menores de edad.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CONSUMO DEL ALCOHOL

El informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018,(8) advierte que cerca de 3 millones de las muertes ocurridas en todo el mundo estarían relacionadas con el uso nocivo del alcohol, lo que representa 1 de cada 20 muertes del total, siendo $\frac{3}{4}$ partes de ellas hombres. El 28% de todas las muertes atribuibles por alcohol se debieron a lesiones (accidentes, violencia, etc.), el 21% a trastornos digestivos, el 19% a enfermedades cardiovasculares, y el resto a enfermedades infecciosas, cánceres, trastornos mentales y otras afecciones. Europa, aunque ha disminuido su consumo desde el 2010 en más del 10%, sigue liderando el mayor consumo per cápita del mundo. Esta reducción se dio tras la puesta en marcha de estrategias propuestas por la OMS en los países miembros, tales como no vender alcohol a menores de edad, incrementar los impuestos sobre el mismo y la disminución de la publicidad.(9)

En cuanto al consumo en los jóvenes , el informe indica que más de una cuarta parte de ellos con edades comprendidas entre los 15 y 19 años son bebedores (27%), siendo la mayor tasa de consumo encontrada en Europa (44%) y con un inicio partir de los 15 años en un rango de 50-70% de los casos.(8). Por tanto, la OMS prevé un incremento del consumo en la región en los próximos 10 años.

España tiene un consumo de alcohol *per capita* de 10 litros por año en mayores de 15 años, por encima de la media europea (9,8 litros). Sin embargo, ha habido un descenso con respecto a los datos obtenidos en el 2010 para España y Europa respectivamente (10,5 L y 11,2 L). El consumo excesivo de alcohol, definido como beber por lo menos 60 g de alcohol en una ocasión en los últimos 30 días (episodio de embriaguez), es especialmente peligroso para la salud. Según el informe de la oficina regional para Europa de la OMS, en la población española de más de 15 años, se presentó al menos un episodio de embriaguez de estas características en el 25,6% de personas; estas cifras ascienden hasta el 28,0% si se analiza solo el grupo de edad de entre 15 y 19 años, y hasta el 49,5% si se pregunta solo a los bebedores habituales de este último grupo de edad. (10)

El Plan Nacional sobre Drogas realiza cada dos años en España, la *Encuesta domiciliaria Sobre Alcohol y Drogas (EDADES)* a población no institucionalizada entre los 15 y 64 años para conocer el patrón de consumo de los españoles. Estos resultados son publicados dentro del informe anual del Observatorio Español sobre Drogas. En el periodo de recogida de 2017 y 2018, el alcohol continúa siendo la droga más consumida por los ciudadanos. En esta franja de edad, el 91,2% han consumido bebidas alcohólicas alguna vez en la vida, el 75,2% lo ha consumido en el último año, (el 77,6% lo hacía en

2015, presentando así un descenso con respecto a las últimas encuestas), el 62,7% en el último mes y el 7,4% diariamente en el último año. El 60% de los menores encuestados ha consumido alcohol en el último año, comparado con el 58% de la encuesta previa. La edad en que se inicia el consumo es de 16,6 años, no presentando grandes cambios con las últimas encuestas. El 5,1% de los encuestados ha realizado un consumo de riesgo (ESCALA AUDIT ≥ 8), situación que se mantiene estable desde 2009. La borrachera en el último año, es reconocida por 18,6%, aumentando este porcentaje con respecto a los registros del 2015 (16,8%).

El *binge drinking*, o consumo excesivo episódico o circunstancial o consumo intensivo o también conocido como “en atracón”, se define al consumo de 5 o más bebidas alcohólicas en una ocasión de aproximadamente 2 horas en hombres y 4 o más bebidas alcohólicas en una ocasión de aproximadamente 2 horas en mujeres. En la última encuesta, el 15,1% de la población reconoce haber practicado este tipo de consumo en los últimos 30 días, dato inferior al observado en 2015 (17,9%).(11)

El consumo de alcohol, se asocia a su vez a un mayor consumo de otras sustancias, sobre todo si el consumo del mismo es intensivo o *binge drinking*, tal como se vio reflejado en la última edición de dicha encuesta, donde el policonsumo fue más prevalente en el grupo que hizo botellón en los últimos 12 meses en la franja de edad de 15 a 24 meses, 59,7% con respecto al que no hizo botellón, 39,4%.

Según el Informe anual del Sistema Autonómico de Información sobre Toxicomanías de Castilla y León, en el año 2017 se admitieron para iniciar un tratamiento ambulatorio por consumo de sustancias psicoactivas a 1844 personas, de las cuales, el 31% consumían alcohol, siendo este consumo mayor en hombres (74,8%). La

edad media de inicio de tratamiento fue de 47,3 años hombre y 45,7 años mujer. La edad media al inicio del consumo para el hombre fue de 15,6 años, y para la mujer, 18,8 años. (12)

EL ALCOHOLISMO Y LOS PATRONES DE CONSUMO

La Organización Mundial de la Salud definió el alcoholismo en 1976 a través del síndrome de dependencia alcohólica: “un estado psíquico y habitualmente también físico resultado del consumo de alcohol, caracterizado por una conducta y otras respuestas que siempre incluyen compulsión para ingerir alcohol de manera continuada o periódica, con objeto de experimentar efectos psíquicos o para evitar las molestias producidas por su ausencia”.(13) Dentro del término alcoholismo se incluían en el DSM-IV el trastorno por dependencia del alcohol y el trastorno por abuso de alcohol (Asociación Americana de Psiquiatría, 2002), que posteriormente se han definido como trastorno por uso de alcohol (*alcohol use disorder*) tras la publicación en 2013 del DSM-5.(14) La OMS en 1992, denominó al trastorno por abuso de alcohol como “consumo perjudicial de alcohol” y lo definió como el consumo de alcohol que está afectando ya a la salud física o mental.(15)

En este trabajo, se utilizarán los términos dependencia y adicción de modo indistinto, de acuerdo a los conceptos del DSM-IV,(16) con los que fueron recogidos la mayoría de pacientes incluidos en el estudio. Sin embargo, es necesario aclarar que actualmente es más preciso hablar de adicción que de dependencia, dada las últimas recomendaciones del DSM-5,(14) debido a que aspectos como la tolerancia o el síndrome de abstinencia, que caracterizan a la dependencia, también están presentes en

algunos pacientes como respuesta a algún tratamiento crónico y apropiado y que no le genera adicción.

La OMS expone tres elementos que se deben tener en cuenta para valorar el daño producido por el consumo de alcohol: el patrón de consumo, el volumen consumido y en menor medida, a la calidad del alcohol consumido.(3)

-Patrones de consumo de alcohol: se pueden analizar cuatro patrones: (17)

El Consumo de riesgo, el cual puede causar daños a futuro, tanto físicos como psicológicos o sociales.

El Consumo nocivo o perjudicial, en el cual la persona presenta ya un daño físico, psíquico, familiar, social, problemas legales o económicos relacionados con el consumo

El patrón de ingesta de grandes cantidades de alcohol en una sola ocasión de consumo, “botellón” o consumo “en atracón” o *binge drinking* como lo define el Instituto Nacional sobre el Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA), consiste en un patrón de consumo que produce concentraciones de etanol en sangre mayores de 0,08% (0,8 g/L); lo anterior equivale a consumir 5 o más bebidas alcohólicas en hombres y 4 o más bebidas alcohólicas en mujeres en un intervalo de 2 horas.(18) Es muy perjudicial porque este tipo de consumo está relacionado con intoxicaciones, coma y muerte.

La Dependencia alcohólica: grupo de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos que se desarrollan después de la ingesta crónica de alcohol, asociado a un fuerte deseo de consumir, presentando dificultades para controlar el consumo a pesar de

las consecuencias negativas. Se le da prioridad al consumo que a otras actividades u obligaciones. Ver criterios en la Tabla 1. El abuso de alcohol y la dependencia alcohólica (tabla 2) eran los dos patrones de consumo de alcohol definidos por la Asociación Americana de Psiquiatría (APA) en el DSM-IV(16) y que se han fusionado recientemente en el DSM-5(14) con el término “Trastorno por uso de alcohol” y cuyos criterios se expresan en la Tabla 3.

-Volumen consumido: hay una relación dosis respuesta en muchas de las enfermedades causadas por el alcohol como por ejemplo los cánceres asociados con el alcohol: a mayor consumo, mayor riesgo de desarrollo del mismo. La unidad de bebida estándar (UBE) es la unidad de bebida utilizada para cuantificar el consumo de alcohol, donde 1 UBE en España equivale a 10 gramos de alcohol puro (un vaso de vino, una caña de cerveza, o medio vaso de una bebida de alta graduación como el whisky). La OMS define al consumo de riesgo de alcohol en términos de volumen, como el consumo medio regular de 40g diarios de alcohol en mujeres, y más de 60 g diarios en hombres. En nuestro medio equivale a la ingesta de al menos 28 UBE por semana o más de 5 UBE por ocasión de consumo en hombres y de 17 UBE a la semana o más de 3 UBE por ocasión de consumo en las mujeres y en los mayores de 65 años.

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

Tres o más de estas manifestaciones deben haber estado presentes durante al menos un mes; si han durado menos de un mes, deben haber aparecido juntas de forma repetida en algún período de doce meses

* Tolerancia, de tal manera que:

- Se requiere un aumento progresivo de la dosis de alcohol para conseguir los mismos efectos que originalmente producían dosis más bajas; lograr la intoxicación o conseguir el efecto deseado

- Se obtiene un efecto marcadamente disminuido con el uso continuado de la misma cantidad de alcohol

* Síntomas somáticos de un síndrome de abstinencia, cuando se confirme por:

- El síndrome de abstinencia característico del alcohol con el cese o disminución del consumo

- El consumo de la misma sustancia (o una muy próxima) con la intención de aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

* Deseo intenso o vivencia de una compulsión a consumir alcohol

* Disminución de la capacidad para controlar el consumo de alcohol, unas veces para controlar el inicio del consumo y otras para poder terminarlo o para controlar la cantidad consumida, demostrado por:

- El alcohol se consume en mayores cantidades o durante un período más largo de lo que se pretendía inicialmente

- Existen deseos persistentes o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el uso de alcohol

* Preocupación con el alcohol, tal como se manifiesta por:

- Abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversiones a causa del consumo de alcohol

- Aumento del tiempo necesario para obtener o ingerir el alcohol o para recuperarse de sus efectos

* Persistencia en el consumo de alcohol a pesar de sus evidentes consecuencias perjudiciales, tal y como se evidencia por el consumo continuado una vez que el individuo es consciente, o era de esperar que lo fuera, de la naturaleza y extensión del daño

Tabla 2. Criterios de abuso y dependencia de alcohol del DSM-IV

ABUSO
<p>Deterioro o malestar clínicamente significativos en un periodo de doce meses manifestado por uno o más de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none">*Incumplimiento de obligaciones en el trabajo, en la escuela o en casa.*Consumo recurrente del alcohol en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso.*Problemas legales repetidos relacionados con el alcohol.*Problemas sociales continuos o recurrentes.*Problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos del alcohol.
DEPENDENCIA
<p>Un patrón desadaptativo de consumo de alcohol que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, manifestado por tres (o más) de los siguientes 7 criterios, que ocurran en cualquier momento, de un período continuado de 12 meses:</p> <ul style="list-style-type: none">*Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes:<ul style="list-style-type: none">- Necesidad de cantidades marcadamente crecientes de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado-Efecto marcadamente disminuido con el consumo continuado de las mismas cantidades de alcohol

* Abstinencia, definida por cualquiera de los siguientes:

- El síndrome de abstinencia característico para el alcohol (ver DSM-IV para más detalles)

-El alcohol es ingerido para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

* El alcohol es frecuentemente ingerido en cantidades mayores o durante un período más prolongado de lo que inicialmente se pretendía

* Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de alcohol

* Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención del alcohol, en el consumo del alcohol o en la recuperación de los efectos del mismo

*Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo del alcohol

*Se continúa ingiriendo alcohol a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que son causados o exacerbados por el consumo del alcohol (p. ej., ingesta continuada de alcohol a pesar de que empeora una úlcera)

Tabla 3. Criterios para el trastorno por uso de alcohol según DSM-5

Patrón desadaptativo de consumo de alcohol que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por dos (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

Ítem 1. La sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía

Ítem 2. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de alcohol

Ítem 3. Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con el consumo o la obtención de alcohol

Ítem 4. Deseo de consumo irrefrenable

Ítem 5. Incumplimiento de obligaciones

Ítem 6. Consumir alcohol a pesar de sus consecuencias en las relaciones familiares e interpersonales

Ítem 7. Reducción de actividades socio-laborales, familiares o recreativas

Ítem 8. Consumo de alcohol en situaciones peligrosas

Ítem 9. Persistencia del consumo a pesar de las consecuencias físicas o psicológicas causadas o exacerbadas por el consumo de alcohol

Ítem 10. Tolerancia

Ítem 11. Abstinencia

Criterios de gravedad: Leve: 2-3 ítems Moderado: 4-5 ítems Grave: 6-11 ítems

CUESTIONARIOS DE VALORACIÓN DEL CONSUMO DE RIESGO

Se cuenta en la actualidad con cuestionarios de detección o cribado que orientan sobre los posibles patrones de consumo de forma precoz, para posteriormente ser evaluados de forma exhaustiva por medio de herramientas diagnósticas como las mencionadas en el apartado anterior, junto con una entrevista clínica detallada y la exploración física. Un resultado negativo en el cribado puede constituir falsos negativos por lo que hay que complementarlos con pruebas biológicas y entrevistas a acompañantes antes de descartar la presencia de consumo excesivo de alcohol. Los más utilizados por su validez, brevedad y sencillez son:

- El CAGE (acrónimo obtenido del inglés: *Cut, Annoyed, Guilty, Eye-opener*), que consta de 4 ítems, con una sensibilidad del 65 al 100% y una especificidad por encima del 80%, siendo positivo si se responde afirmativamente al menos dos preguntas, por lo que es de gran utilidad en atención primaria.

- El AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) que está conformado por diez preguntas en relación con la cantidad consumida en el último año, la frecuencia y las consecuencias que ese consumo ha traído.(19) Es útil para discriminar patrones de consumo. La puntuación se encuentra entre de 0 a 40 puntos. Cuando son superiores a 8 es indicativo de bebedor de riesgo, y superiores a 13 indican probable dependencia.

- Otros son el CBA (Cuestionario Breve para Alcohólicos), el MALT o *Münchner Alkoholismus Test*, el MAST o *Michigan Alcoholism Screening Test*, el DPI o Índice de Problemas con la Bebida (diseñado para personas por encima de los 55 años), el AAIS o *Adolescent Alcohol Involvement Scale* (detecta adolescentes con problemas con el alcohol) o el T-ACE y TWEAK (detecta casos de alto riesgo en mujeres). (20)

Tabla 4. Cuestionario CAGE

(Cut down) ¿Ha pensado en alguna ocasión que tenía que reducir dejar la bebida?

(Annoyed) ¿Le han molestado las observaciones de la gente acerca sus hábitos de bebida?

(Guilty) ¿Se ha sentido alguna vez a disgusto o culpable por su costumbre de beber?

(Eyeopen) ¿Alguna vez ha tenido que beber a primera hora de la mañana para sentirse en forma?

Tabla 5. Test de AUDIT (Alcohol use disorders identification test)

1. ¿Con qué frecuencia consume alguna bebida alcohólica?

0. Nunca

1. Una o menos veces al mes

2. De 2 a 4 veces al mes

3. De 2 a 3 veces a la semana

4. Cuatro o más veces a la semana

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

0. Una o 2

1. Tres o 4

2. Cinco o 6

3. De 7 a 9

4. Diez o más

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

0. Nunca

1. Menos de una vez al mes

2. Mensualmente

3. Semanalmente

4. A diario o casi a diario

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

0. Nunca

1. Menos de una vez al mes

2. Mensualmente

3. Semanalmente

4. A diario o casi a diario

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

0. Nunca

1. Menos de una vez al mes

2. Mensualmente

3. Semanalmente

4. A diario o casi a diario

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

0. Nunca

1. Menos de una vez al mes

2. Mensualmente

3. Semanalmente

4. A diario o casi a diario

FACTORES DE VULNERABILIDAD PARA EL CONSUMO

El desarrollo de la adicción al alcohol depende de una compleja interacción de dos tipos de factores: los relacionados con el medio ambiente o su entorno y los intrínsecos del individuo. Dentro de los factores ambientales cabe destacar el desarrollo económico, familiar, social, cultural y la disponibilidad de alcohol según las políticas pertinentes de cada sociedad. Dentro de las características de cada individuo destaca: la cantidad consumida de alcohol, la forma de beber, los antecedentes familiares de consumo de alcohol y con ello la genética de cada individuo. No existe un único factor

de riesgo que determine la adicción, lo cierto es que cuanto más factores entran a jugar en un individuo, será más probable que desarrolle problemas con el alcohol una vez se establezca su consumo.(17)

Resulta sin duda interesante cómo algunos individuos que consumen alcohol no presentan ningún tipo de efecto adverso, mientras que otros bebedores de la misma intensidad, sí presentan patrones patológicos de consumo llegando al estado de adicción. Una explicación podría ser que existen mecanismos biológicos de protección que impiden o retrasan la expresión de las neuroadaptaciones bioquímicas que conducen a los fenotipos asociados con la adicción. Si estos mecanismos de protección dejan de funcionar o no existen, a continuación se pueden presentar las neuroadaptaciones que subyacen al consumo crónico y excesivo de alcohol.(21) Este tipo de consumo puede conducir a los diferentes fenómenos de dependencia al alcohol, por un lado el establecimiento de la tolerancia a los efectos agudos de etanol y por otro lado la susceptibilidad a un síndrome de abstinencia en la ausencia de la droga.

Estos comportamientos son impulsados por dos rasgos característicos de la adicción: una compulsión imperiosa de búsqueda y consumo del alcohol y una incapacidad para controlar o inhibir estas acciones a pesar de que dan lugar a un resultado negativo (por ejemplo, la pérdida del trabajo, el encarcelamiento, problemas familiares, etc.).(22) Estas dos características de la adicción pueden explicarse, según algunas investigaciones, por procesos aberrantes de aprendizaje y de plasticidad en la corteza frontal y cuerpo estriado que se generan tras el consumo crónico.(22,23)

EFFECTOS DEL ALCOHOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

El efecto del alcohol sobre el SNC está ligado a varios factores entre ellos el consumo (agudo o crónico), las características biológicas del individuo y la concentración que alcanza en sangre.(24) Todo ello determina diferentes efectos sobre el SNC, algunos de ellos idiosincrásicos. (25) Así, la intoxicación aguda es el resultado del consumo de grandes cantidades de alcohol en una sola ocasión, trayendo como consecuencia la incoordinación motora y con ello el riesgo de aumento de accidentes de todo tipo; también, una desinhibición de impulsos agresivos y sexuales con lo que aumenta el riesgo de daño propio y hacia los demás. La persona puede presentar amnesia de lo sucedido, sobre todo de aquellos episodios donde su cerebro presentaba la máxima concentración de alcohol. El coma etílico es la consecuencia más grave pues puede llevar a la muerte. Cuantificando la concentración alcanzada en sangre durante un consumo agudo se puede valorar los efectos sobre el SNC, los cuales se resumen en la tabla 6.

Deterioro cognitivo: se ha comprobado en diferentes estudios que a mayor consumo de alcohol disminuye el volumen cerebral, siendo este efecto más importante en las mujeres.(26) El consumo crónico produce un daño neuronal difuso lo que se traduce en un deterioro de la memoria, el aprendizaje, las funciones visoespaciales, la velocidad de procesamiento psicomotor y de las funciones ejecutivas las cuales podrían mejorar con la abstención continuada de alcohol. Algunos estudios de neuroimagen han correlacionado los déficits de memoria episódica y lo que podría ser una atrofia del hipocampo, así como un descenso en el flujo sanguíneo cerebral cuando se valoró en la tomografía por emisión de fotones (SPECT). (27–29)

Tabla 6. Efecto de las concentraciones de alcohol en sangre en un sujeto sin tolerancia

CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA	EFEECTO
0,2 g/L	Disminución de las inhibiciones. Sensación de ebriedad, excitación
0,8 g/L	Disminución de funciones cognitivas complejas y del rendimiento motor
2 g/L	Incoordinación motora, irritabilidad, disminución de la percepción del riesgo
3 g/L	Coma superficial. Alteración de los signos vitales
4 g/L	Muerte

Modificado de Harrison: Principios de Medicina Interna. 19ª Edición. Sección 5. Alcohol y Alcoholismo

Encefalopatías de origen enólico: pueden ser secundarios a mecanismo tóxicos directos del etanol sobre las neuronas, déficit nutricional y vitamínico o lesiones neuronales durante los episodios de abstinencia grave. (30) Por ejemplo, La encefalopatía de Wernicke se produce por un déficit de tiamina, que cursa con

nistagmo, parálisis del motor ocular externo, ataxia, confusión, apatía y somnolencia. Como secuela, en aquellos que no han recibido un tratamiento adecuado con tiamina, se observa un trastorno amnésico persistente o Síndrome de Korsakoff que cursa con amnesia anterógrada e importantes consecuencias psico-sociales.(31)

La ataxia cerebelosa alcohólica es una degeneración del cerebelo que se caracteriza por una incoordinación motora, ataxia en extremidades inferiores, ampliación de la base de sustentación, disartria y temblor postural.

La demencia alcohólica se considera que se debe a un efecto tóxico directo del alcohol. En los estudios de neuroimagen se puede observar un deterioro del cuerpo calloso, atrofia cerebral, hiperintensidad de la sustancia blanca y aumento de tamaño de los surcos y ventrículos cerebrales. Cursa con graves dificultades de aprendizaje que impiden que el paciente se pueda beneficiar de la psicoterapia. (27,28)

El síndrome de Marchiafava-Bignami incluye la degeneración del cuerpo calloso y cursa con disfasia, confusión y convulsiones.(32)

El síndrome de desmielinización osmótica (anteriormente mielinolisis central pontina) es una encefalopatía grave que se produce sobre todo en pacientes alcohólicos desnutridos y en el contexto de una corrección rápida de la hiponatremia. Cursa con síntomas bulbares y puede conducir a la muerte. (28)

El Síndrome de abstinencia alcohólica (SAA) se caracteriza por una mayor excitabilidad del SNC que pueden dar lugar a alucinaciones y convulsiones. Se clasifica en SAA mayor y menor. El SAA mayor, también llamada *delirium tremens* es un estado de confusión, agitación psicomotriz y de alucinaciones que aparece tras un

descenso rápido e intenso de las concentraciones de alcohol en un paciente bebedor crónico. Puede dar lugar a crisis convulsivas (también llamadas *rum fits*) con lo que puede empeorar el daño neuronal ya existente.(33,34)

El efecto del alcohol sobre el SNC es en ocasiones muy complejo y no queda claramente establecido si el daño se debe a las secuelas de un episodio de encefalopatía de Wernicke, al daño crónico que produce demencia alcohólica o a otras causas. En este contexto se ha acuñado el término ARBI (*alcohol related brain injury*) o ARCI (*alcohol related cognitive impairment*), concepto cuya definición e implicaciones todavía está en desarrollo.(35)

Dentro de las enfermedades neuropsiquiátricas, los trastornos que se observan más frecuentemente en la población alcohólica son: el trastorno de personalidad antisocial (21 veces más frecuente), la manía (6,2 veces más frecuente), la esquizofrenia (4 veces más frecuente) y el abuso de otras drogas (3,9 veces más frecuente). La depresión y los trastornos de ansiedad, se pueden observar en este grupo de pacientes, en lo que se conoce como patología dual.(36) Los trastornos psiquiátricos se producen por el efecto tóxico de un consumo excesivo y crónico. Los trastornos afectivos, los de ansiedad, del sueño, sexuales y confusionales, que han sido inducidos por el alcohol, tienden a remitir de forma espontánea cuando la persona deja de consumirlo; en cambio, los trastornos psicóticos, el trastorno amnésico persistente y la demencia alcohólica, no suelen mejorar del todo tras un periodo continuo de abstinencia, aunque podrían mejorar. (25)

Alteraciones del sueño: los pacientes alcohólicos crónicos experimentan una reducción significativa o incluso una ausencia de la fase profunda del sueño y un

aumento de la fase REM (*rapid eye movements*) tras el cese del consumo. Pueden presentar un sueño superficial, fragmentado y con una duración acortada, cuando dejan de beber. Durante el primer año de ausencia de consumo, el sueño mejora lentamente pero algunos aspectos como lo son el conciliar el sueño, la latencia del sueño REM y la sensación subjetiva de alteración del sueño pueden permanecer alterados durante meses y su persistencia puede ser predictor de un mayor riesgo de recaída. El trastorno del sueño podría estar relacionado con un síndrome de abstinencia retardada del alcohol.

(37)

Epilepsia: puede originarse como resultado del consumo de alcohol, más allá de los episodios convulsivos inducidos por la abstinencia (*rum fits*).

Neuropatía periférica: es un hallazgo frecuente en las personas con dependencia del alcohol, entre un tercio y un cuarto de las mismas. Cursa con debilidad, parestesias, dolor, atrofia muscular, disminución de reflejo aquileo y patelar, hipoestesia y sensación urente en las plantas de los pies que empeora con el contacto o la estimulación.

BASES NEUROBIOLÓGICAS DEL ALCOHOLISMO

Hasta la fecha, se han venido estudiando múltiples mecanismos por medio de los cuales el alcohol ejerce su influencia sobre la biología humana y más específicamente sobre los sitios moleculares y genéticos en el cerebro implicados en la génesis del alcoholismo.

Se ha demostrado que el alcohol actúa sobre receptores de membrana, enzimas, canales iónicos y neuroreceptores y otras moléculas, que con el consumo crónico

producen neuroadaptaciones de las sinapsis en las diferentes vías y sistemas que regulan los procesos de motivación, recompensa, memoria, condicionamiento, tolerancia, función ejecutiva, control inhibitorio, interocepción, autoconciencia y que explican los mecanismos de adicción al alcohol. (38–40) Tanto la progresión como la gravedad del cuadro están influenciadas por factores ambientales y genéticos.(22,41) Múltiples circuitos y regiones cerebrales se ven alterados en la adicción al alcohol, involucrados en mayor o menor grado desde el consumo agudo, hasta el consumo crónico. A su vez parece que el consumo crónico de alcohol ejerce influencia sobre los genes cambiando su expresión en ciertos puntos, creando mecanismos que refuerzan el consumo del mismo perpetuando el problema.(42,43)

La dependencia del alcohol se compone de dos mecanismos fundamentales. Por un lado los efectos positivos, producto de la liberación de la dopamina en los centros de recompensa del cerebro estimulada por el alcohol, y, por otro lado, los efectos negativos, debidos a la ansiedad y la depresión que se producen tras dejar de consumir.(44)

En la fase aguda, el alcohol produce síntomas derivados de la producción de acetaldehído, metabolito primario del alcohol y responsable del efecto *flushing* del mismo y aunque la duración de sus efectos se cuantifican en horas, algunos estudios señalan que el acetaldehído está implicado en el desarrollo de la dependencia alcohólica(45,46) En esta fase, se producen cambios a nivel celular que pueden durar varias horas. El consumo crónico produce neuroadaptaciones que pueden perdurar a lo largo de la vida.(47) La transición del consumo moderado al excesivo o incontrolado resulta a su vez de neuroadaptaciones que causan un aprendizaje motivacional aberrante

y de memoria.(48) Todo lo anterior se traduce en una remodelación de las sinapsis que depende también de cambios en la expresión de diferentes genes tras la exposición crónica al alcohol. Dentro de las áreas cerebrales implicadas en la adicción al alcohol encontramos:

-Área de la recompensa o sistema meso-cortico-límbico dopaminérgico, denominado también como sistema dopaminérgico de recompensa. Modula funciones fisiológicas primarias relacionadas con la supervivencia, incluyendo la ingesta de alimentos, de agua y el comportamiento sexual y juega un papel crucial en la patogénesis del trastorno por consumo del alcohol y otras sustancias, por su rol gratificante y de refuerzo que ejerce en el cerebro.(49) Los dos grandes centros cerebrales implicados en la dependencia de sustancias son el núcleo *accumbens* o estriado ventral y el área del tectamento ventral (sistema mesolímbico dopaminérgico), este último rico en células dopaminérgicas que envía sus proyecciones hacia el núcleo *accumbens*; a su vez, este núcleo establece conexiones con otras zonas del cerebro como son la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.(50) El núcleo *accumbens*, en el sistema dopaminérgico mesolímbico, cumple funciones integradoras, como dirigir el comportamiento del sistema límbico y la corteza prefrontal y el aumento de su activación del núcleo se ha asociado con conductas como la impulsividad y los comportamientos de externalización.(51). El sistema GABA, clave en la adaptación al consumo de alcohol, regula de forma inhibitoria la función dopaminérgica en este núcleo.(52)

Con el consumo agudo de alcohol se produce un aumento de la concentración de dopamina en el núcleo *accumbens*, generando un estado de motivación y placer. La

capacidad del alcohol de generar aumento en la concentración de dopamina es lo que le confiere precisamente esa capacidad de sustancia reforzadora.(38) El incremento de la concentración de dopamina y de la activación del sistema mantenida en el tiempo, termina provocando una disminución progresiva en el funcionamiento del sistema mesolímbico, disminuyendo los niveles de dopamina en el núcleo *accumbens*, lo que tendrá su correlato en el síndrome de abstinencia. Así, la deficiencia de dopamina produce una disminución en la capacidad de sentir placer, lo que incrementa la búsqueda y el consumo de alcohol.(48) En estudios realizados con tomografía por emisión de positrones (PET) se ha comprobado de hecho una disminución del transportador de la dopamina en los ganglios basales; esto conlleva un descenso en la capacidad de sentir placer ante los estímulos normales o naturales de la vida como por ejemplo dormir, comer, tener relaciones sexuales, logros en el trabajo, entre otros, por lo que estas personas terminan abandonando estas actividades. El sistema anti-recompensa o de refuerzo negativo es de esta forma el responsable de los síntomas de malestar físico o emocional al suspender el consumo (síndrome de abstinencia), que puede conducir a la necesidad de continuar consumiendo (la recaída). Este malestar emocional se debe en parte a una dis-regulación del sistema límbico, principalmente de la amígdala, responsable de los síntomas emocionales potenciados por cambios en el sistema noradrenérgico que dan lugar a los síntomas de ansiedad, depresión o malestar psicológico y por otro lado los cambios físicos derivados de la activación del factor liberador de la corticotropina (FLC) y activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.(53). La exposición crónica al alcohol y la abstinencia pueden desencadenar la desregulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y el circuito de

recompensa por estrés del cerebro, lo que conduce a una espiral creciente de estrés, síntomas afectivos negativo y consumo de alcohol.(54)

-Área de la memoria y el aprendizaje: compuesta por la amígdala y el hipocampo (sistema límbico). El sistema límbico desempeña una función clave en el desarrollo de la dependencia al interactuar con la corteza y el núcleo *accumbens*. (47,52) Las estructuras más destacadas de este sistema son el hipocampo, que cumple funciones de memoria, y la amígdala, de importancia en la regulación emocional. Este sistema atribuye un significado emocional al consumo ante la exposición a ciertos estímulos, creando procesos de aprendizaje estímulo-consumo-recompensa. Estos procesos se establecen al realizar asociaciones entre estímulos internos (frustración, tristeza, ira, soledad o estrés) y externos (una persona, una situación en particular, luces, una canción, una botella) mientras se consume alcohol. Si estos estímulos son agradables se produce un refuerzo positivo por beber, sin que necesariamente lo esté mediando el efecto farmacológico de la sustancia. Lo anterior contribuye al fenómeno de anticipación o condicionamiento, que es la situación por la cual la persona sigue consumiendo aunque haya perdido los mecanismos naturales de producción de placer. Este mecanismo resulta fundamental para propiciar las recaídas y por tanto uno de los tantos desafíos en la investigación de tratamientos que eviten esta situación tras periodos de abstinencia.(55)

El sistema amigdalario recibe información de todos los sentidos por lo que parece tener un papel clave en dichos mecanismos de aprendizaje y de asociación. Se ha descrito recientemente a la amígdala central como un centro de ansiedad y adicción.

(56)Entre los consumidores, puede existir la percepción de control del estrés tras la ingesta de alcohol gracias la liberación pre-sináptica de GABA tras el consumo crónico con mejora de la función del receptor post-sináptico de GABAA en la amígdala central, resultando en una reducción aguda de la ansiedad y la capacidad de respuesta al estrés y esta sería otra razón que explicaría el consumo y las recaídas. (54)

Por otra parte, de la amígdala se originan las proyecciones glutamatérgicas que se dirigen hacia el núcleo *accumbens*. El glutamato modula la actividad y liberación dopaminérgica en dicho núcleo.(57) Las personas con historia de mayor adicción tienen más estímulos condicionados (internos o externos), por ende, mayor susceptibilidad a la respuesta frente a los mismos y mayor riesgo de recaída. Además, parece ser que la sola expectativa que genera el poder consumir alcohol en la persona, aumenta los efectos reforzantes de este. La activación cerebral y conductual es más intensa con el solo hecho de esperar los efectos reforzantes del alcohol, que con solo el consumo en un momento dado sin haberlo buscado.(52,57,58)

-Área de la motivación y del control ejecutivo, que forma parte del sistema mesocortical. La corteza frontal es la encargada de los procesos ejecutivos y participa en la planificación e ideación de cómo adquirir la sustancia que se desea consumir. Con el consumo crónico de alcohol, la corteza frontal sufre profundos cambios en su estructura. Estudios con PET evidencian una disminución del metabolismo de la glucosa de forma generalizada en la corteza, principalmente en la frontal, lo que se traduce en hipofunción. Esto genera una alteración del área de control de impulsos y del juicio, llevando a las personas a tener conductas impulsivas, agresivas, inapropiadas y

sobre todo, un juicio disminuido frente a las posibles consecuencias de los actos.(52,58,59)

EL ALCOHOL Y LAS VÍAS DE NEUROTRANSMISIÓN

Existen varias dianas y vías de neurotransmisión en el cerebro donde el alcohol ejerce cambios tras el consumo crónico, entre las cuales destaca la neurotransmisión relacionada con el ácido γ -aminobutírico A (GABA), el N-metil-D-aspartato (NMDA), la glicina, 5-hidroxitriptamina-3 (5-HT3), los receptores neuronales de acetilcolina (nACh), los sistemas dopaminérgico, opioide, noradrenérgico y de los endocannabinoides, así como en el factor liberador de corticotropina. Además ejerce su acción en los mecanismos de señalización intracitoplasmática tras la activación de señales intracelulares mediadas por activación de canales iónicos y no iónicos de membrana.(60,61)

El Factor Neurotrófico derivado del Cerebro (BDNF)

El BDNF es un miembro de la familia de las cisteínas, de las que hacen parte el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina- 4/5 (NT4/5).(63) Son producidos por neuronas noradrenérgicas, dopaminérgicas, colinérgicas y astrocitos y juegan un papel importante en el crecimiento, proliferación, plasticidad y diferenciación celular en el SNC, así como en la actividad de neurotransmisores como la dopamina. (63,64) El BDNF es el factor neurotrópico más abundante del cerebro, y actúa en el hipocampo, la corteza, y áreas basales del cerebro anterior, las cuales son fundamentales para el aprendizaje, la memoria y el pensamiento superior.(66) Es un factor angiogénico y está relacionado también con la respuesta

vascular y hemodinámica al alcohol.(63) Se une a los receptores de quinasa relacionada con tropomiosina (receptores tirosina kinasa tipo B [TrkB]) y forma parte de vías de señalización cerebral implicadas en la neurogénesis, diferenciación y maduración neuronal; su deficiencia en circuitos neuronales clave se asocia con el desarrollo de trastornos psiquiátricos, incluyendo el alcoholismo. (61,66)

Existen evidencias del papel del BDNF en la patogénesis de la dependencia alcohólica.(68–70) . Así, está implicado en los cambios neuroadaptativos en el sistema dopaminérgico y glutamatérgico, los cuales subyacen al abuso y a la dependencia de psicoestimulantes.(66,70,71) Es responsable de la expresión normal del receptor D3 de la dopamina y el neuropéptido Y en el núcleo *accumbens*, donde recibe proyecciones mesolímbicas del área del tectamento ventral.(73–75) Se puede también considerar que el BDNF es un indicador de la neurotoxicidad del alcohol dado que el bloqueo que genera esta sustancia sobre los receptores NMDA disminuye la expresión de BDNF, lo que a su vez contribuye a la neurotoxicidad por etanol.(76) En consecuencia, se ha encontrado un descenso en los niveles de BDNF en pacientes dependientes del alcohol.(68,76) El descenso en las diferentes áreas del cerebro se asocia con un mayor consumo y puede también predisponer al mismo. Por ejemplo, a nivel del núcleo central (CeA) y medial de la amígdala (MeA) se ha relacionado con comportamientos excesivos de consumo de alcohol. En estudios preclínicos en modelos animales, cuando se han incrementado los niveles de BDNF en los diferentes circuitos cerebrales: corteza frontal, amígdala, hipocampo y cuerpo estriado dorsal se ha asociado con disminución de la ingesta de alcohol. (61,76)

En estudios *in vitro*, la exposición aguda a etanol incrementa la expresión del BDNF en neuronas del hipocampo y en estructuras del cuerpo estriado, lo que conlleva una disminución de la sensibilidad y el consumo del alcohol. Con el consumo crónico se pierde progresivamente esta capacidad, por lo que se perpetúa el consumo del mismo, con inicio de la ingesta compulsiva, perdiendo así la capacidad de neuroprotección frente al alcohol.(21,77) Se ha visto en estudios realizados tanto en humanos como en ratas, una relación de los bajos niveles de BDNF en el hipocampo y la neurodegeneración, siendo un posible marcador de las funciones cognitivas de los pacientes dependientes del alcohol.(79–81) Finalmente, el BDNF también parece implicado con el periodo de abstinencia, dado que en este momento se ha comprobado un aumento en los niveles de esta sustancia, que si se mantienen elevados en el tiempo podrían conferir protección frente a la recaída.(78,81,82)

El neuropéptido Y (NPY)

El NPY es un neuropéptido de 36 aminoácidos que se expresa abundantemente en el SNC, principalmente en la corteza, el núcleo estriado, la amígdala, en el hipotálamo, sobre todo en el núcleo arcuato y paraventricular, así como sustancia gris periacueductal y el septum. Ejerce su efecto a través del enlace a receptores de la súper familia de las proteínas G, e interviene así en la regulación de la motivación, memoria, las emociones, el apetito, el consumo de sustancias, con un importante efecto ansiolítico; además, interviene en la regulación del ciclo circadiano, crecimiento de tejido del SNC y plasticidad.(83,84)

El NPY se distribuye abundantemente en la amígdala, sitio que regula los estados afectivos negativos; dada su localización, se ha investigado el papel que juega

en la regulación de conductas similares a las que producen ansiedad en el trastorno por consumo del alcohol. (60,85,86) Podría de esta forma contribuir a la fisiopatología de la depresión y estrés en las conductas adictivas, dado que en estas situaciones se ha observado una disminución de sus niveles en el LCR y plasma. Los primeros estudios que encontraron la posible relación de este gen con el desarrollo de alcoholismo se hicieron en roedores, donde se ha evidenciado que la actividad anormal o baja de NPY a nivel central puede promover un elevado consumo de alcohol y que NPY modula el consumo de alcohol a través de sus receptores tipo Y1 e Y2.(88) De esta forma, el consumo agudo incrementa los niveles del péptido mientras que en los periodos de abstinencia disminuyen. (85,88) Así mismo, las ratas transgénicas que sobreexpresaban el NPY consumían menos alcohol y mostraban un incremento de la sensibilidad a los efectos sedativos que produce la ingesta de altas dosis de esta sustancia.(86) Tras la retirada del alcohol, se observaron niveles más bajos de NPY en los núcleos centrales y medial de la amígdala, estría terminal, cortical, y estructuras hipotalámicas de las ratas que preferían consumir alcohol frente a las que no, contribuyendo así a los síntomas de abstinencia.(60,85,89–92)

El sistema gabaérgico

El ácido γ -amino-butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, presente en la zona pre sináptica de las neuronas de prácticamente todo el cerebro. Ejerce sus efectos a través de sus receptores GABA-A y GABA-B. El primero de ellos, el más relevante, constituye un complejo proteico de 5 subunidades,(94) que forman un canal transmembrana neuronal. Estos receptores GABA-A son sensibles al alcohol, se encuentran en diferentes partes del cerebro y están muy implicados en los

efectos agudos y crónicos del mismo, incluyendo la tolerancia y dependencia. (95) La activación del receptor GABA-A media los efectos conductuales del alcohol como la descoordinación motora y la sedación entre otros.(96)

La mayor parte de los genes de los receptores GABA-A se encuentran en el cromosoma 4 (*GABRA2*, *GABRA4*, *GABRB1* y *GABG2*), en el cromosoma 5 (*GABRA1*, *GABRA6*, *GABRB2* y *GABRG2*) y en el cromosoma 15 (*GABRA5*, *GABRB3* y *GABRG3*). El principal estímulo para este receptor procede de la unión con el GABA, pero existen otras sustancias que también lo pueden estimular, como las benzodiazepinas y los barbitúricos.(97) De hecho, varios efectos conductuales de etanol como son el ansiolítico, atáxico y sedante/hipnótico, pueden explicarse por una modulación alostérica sobre el receptor: al producirse la activación del receptor se produce la apertura del canal, lo que da lugar al paso de iones cloro a través del mismo, produciéndose una hiperpolarización de la membrana que trae como resultado la disminución de la excitabilidad y funcionalidad de la neurona. (95,97) El etanol también ejerce su efecto sobre este receptor por mecanismos de fosforilación y desfosforilación, potenciando la acción del GABA y de otras sustancias agonistas.(41)

Además de este efecto sobre el receptor, el alcohol es capaz de incrementar la liberación pre sináptica del GABA y la liberación de esteroides GABAérgicos.(41) Las sustancias que aumentan la actividad del receptor GABA-A por ser agonistas en el sistema nervioso central, como las benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides depresores, mejoran la sensibilidad aguda al etanol, así como mejoran los síntomas de abstinencia, mientras que los fármacos que actúan como antagonistas de GABA a nivel de sus receptores GABAA, disminuyen muchas acciones agudas de etanol y reducen la

preferencia al consumo del mismo.(96,98–100) Así, en ratones *knockout* para algunas subunidades del receptor GABA-A se evidenció un menor consumo de alcohol, lo que sugiere la importancia particular de los receptores GABA-A en los mecanismos de refuerzo.(101,102)

El consumo crónico de alcohol puede a su vez producir diferentes adaptaciones funcionales (plasticidad) en la expresión de los receptores GABA-A que hace que disminuya la sensibilidad de los mismos al GABA, es decir, se produce una hipofunción de los mismos.(104) Estos cambios traen como consecuencia incrementos en la excitabilidad del SNC cuando cesa el consumo de alcohol, propios de la abstinencia y responsable de buena parte de las manifestaciones de este síndrome, y también pueden contribuir a la incoordinación motora y el deterioro cognitivo asociados al consumo de etanol.(100,104)

Por otra parte existen unos segundos receptores, GABA-B que son receptores metabotrópicos transmembrana para el GABA y que actúan como segundos mensajeros uniéndose a proteínas G. La activación de este receptor conlleva a una inhibición de los canales calcio, con hiperpolarización de la membrana y una disminución en la excitabilidad neuronal. El etanol unido al GABA-B induce respuestas sinápticas que podrían estar relacionadas con las alteraciones mentales y del rendimiento motor presentes en individuos con intoxicaciones agudas.(61)

El sistema glutamatérgico

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia. Sus receptores se dividen en dos grupos de acuerdo a su mecanismo de acción. Un primer grupo es el de los receptores ionotrópicos del glutamato: NMDA (*N-methyl-D-aspartic acid*), AMPA

(*α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid*) y kainato, estos últimos forman un canal iónico que se activa una vez el glutamato se une al receptor. Un segundo grupo lo constituyen los receptores metabotrópicos del glutamato que de forma indirecta activan canales iónicos en la membrana y posteriormente activan cascadas de señalización por medio de proteínas G.(61) Este neurotransmisor tiene desempeña un papel importante en el hipocampo y el aprendizaje.(105,106)

El efecto del etanol sobre el sistema glutaminérgico se establece principalmente sobre la inhibición de los receptores ionotrópicos del glutamato y dentro de estos, los receptores NMDA son los más sensibles a los efectos del etanol. Estos se componen de 4 subunidades que forman un canal catiónico cuya activación conlleva una hiperpolarización de la membrana al incrementar la permeabilidad para los iones sodio, potasio y calcio. Estos receptores se regulan por fosforilación mediante las tirosin-kinasas.(107) Este canal está habitualmente bloqueado por un ion Mg^{2+} , lo que impide el flujo intracelular de Ca^{2+} , evitando así, la potencial toxicidad intracelular que generaría altas concentraciones de Ca^{2+} .(61)

El alcohol ejerce su acción antagónica sobre los receptores NMDA a altas concentraciones, interfiriendo con la transmisión de glutamato en el hipocampo y con ello la liberación de otros neurotransmisores. Estos cambios pueden explicar los *blackouts* o pérdidas de la memoria como efectos de la intoxicación etílica, y que con el consumo crónico pueden llevar a la perturbación de la potenciación, proceso asociado con el aprendizaje y la memoria.(107) Como compensación a esa acción inhibitoria, el organismo produce una mayor cantidad de receptores NMDA, una de las adaptaciones cerebrales durante el consumo crónico y excesivo de alcohol.(61)

Durante los periodos de abstinencia agudos, dada la gran cantidad de receptores NMDA acumulados, se produce un aumento de actividad glutamatérgica, sumado a la baja capacidad inhibitoria de los receptores GABA-A, produciéndose una hiperexcitación que trae como consecuencias las crisis convulsivas, hipertensión, hiperactividad, confusión y alucinaciones propios del delirium tremens.(41) Además, el aumento de flujo intracelular de calcio que se produce en los periodos de abstinencia puede ser una de las causas de las pérdidas de memoria y de muerte neuronal que conlleva a la demencia alcohólica. El empleo de antagonistas NMDA podría, por tanto, evitar estos procesos aunque las indicaciones clínicas de su uso no están claramente establecidas. (61)

Los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales el alcohol produce alteraciones en estos receptores no son claros. Algunas hipótesis plantean la posible relación con la disminución del ion magnesio que se suele ver en los pacientes bebedores crónicos, y que normalmente, se encuentra bloqueando el receptor y la interferencia en la fosforilación y compartimentalización de este receptor. (107,108)

El sistema dopaminérgico

La dopamina hace parte del grupo de las catecolaminas, es derivado del aminoácido tirosina y está estructuralmente relacionada con la norepinefrina. Produce potenciales post-sinápticos inhibitorios. Es el principal neurotransmisor del circuito de refuerzo de recompensa(50) y como tal está implicado en procesos motrices, de la conducta emocional y del aprendizaje y regula secreciones hormonales estrechamente relacionadas con las sensaciones de placer.(41) El sistema dopamínico ejerce una importante influencia sobre el circuito de refuerzo-recompensa del cerebro, como ya se

explicó previamente e incluye: la vía mesolímbica, la nigroestriatal y la tuberoinfundibular.(22) Dentro de la vía mesolímbica existen dos principales proyecciones de dopamina en el cerebro. Una de estas vías se proyecta desde el área de tectamento ventral al núcleo *accumbens* (principal estructura de regulación central del efecto de la recompensa) o estriado ventral, y que parece activarse directa o indirectamente con la mayoría de las sustancias psicoactivas, y la otra es la vía dopaminérgica mesocortical, que se proyecta del área del tectamento ventral a regiones de la corteza cerebral; estas dos proyecciones son las estructuras clave que modulan los circuitos de refuerzo de recompensa.(50) La segunda vía dopaminérgica principal se conoce como la nigroestriada, que se proyecta de la sustancia negra, sitio donde principalmente se produce la dopamina, al estriado, lugar de almacenaje de la misma. (41,108) Existe una tercera vía dopaminérgica, la tuberoinfundibular.(50)

La dopamina se une al receptor de dopamina (DRD) acoplado a proteína que tiene dos subtipos principales de receptores: el tipo D1 (D1 y D5) y el tipo D2 (D2, D3 y D4). En la membrana, un transportador de dopamina impulsa la liberación del neurotransmisor desde el espacio extracelular hasta la neurona pre sináptica (recaptación). Estudios de imágenes en humanos han evidenciado que durante el consumo agudo se produce un aumento de la liberación de dopamina a nivel estriatal.(109,110) Se ha visto en diferentes estudios en ratas, que la estimulación de la transmisión dopaminérgica en el núcleo *accumbens* puede ser necesaria para obtener los efectos gratificantes asociados con el alcohol a dosis bajas, pero no parece que sea clave para otros aspectos que también hacen parte de las acciones reforzantes del alcohol, como por ejemplo, el efecto ansiolítico.(109)

Algunos estudios mostraron que la denervación del núcleo *accumbens* en animales, no interfirió con el consumo o mantenimiento de la respuesta de refuerzo del alcohol.(111,112) Igualmente, la elevación de los niveles de dopamina en el núcleo *accumbens* por un inhibidor de la recaptación selectiva de dopamina, no mostró alteraciones en la autoadministración de alcohol.(114) De todo lo cual se puede deducir que la autoadministración de etanol no depende únicamente de la activación del núcleo *accumbens* por la dopamina;(108,114)

Durante el consumo crónico se ha hipotetizado que se produce un estado de déficit de dopamina en el sistema de recompensa cerebral, lo que podría ser una de las causas de deseo de consumo y de las recaídas del trastorno por uso de alcohol.(116–118) Además, se ha visto una disminución de la producción de dopamina en el núcleo *accumbens* en ratas y una disminución de los receptores de dopamina D2 en dicho núcleo, situaciones que se relacionan con comportamientos relacionados con la búsqueda del alcohol.(119–121) El déficit de transmisión de dopamina en las regiones mesolímbicas, como el estriado ventral, puede contribuir a la anhedonia y a la disminución de la sensibilidad a la recompensa en individuos dependientes del alcohol. Además, en bebedores abstinentes de alto riesgo y en la dependencia del alcohol, las señales que se asocian con el alcohol pueden activar el cuerpo estriado ventral contribuyendo así al riesgo de recaída.(55) El déficit a nivel de la corteza pre-frontal, por otra parte, conllevaría alteraciones en el procesamiento ejecutivo.(122)

Con todo ello resulta lógico plantear el efecto de fármacos sobre la vía dopaminérgica en el trastorno por uso de alcohol, pero la investigación sobre el efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores de dopamina en este campo ha tenido

resultados diversos. Algunos estudios mostraron que la inyección de d-anfetamina (un agonista del receptor no específico dopaminérgico) o quinpirole (un agonista específico del receptor D2/D3) en el área de núcleo *accumbens* puede aumentar los comportamientos de refuerzo relacionados con el alcohol.(38,49) Por otro lado, se ha observado un menor consumo de alcohol en los animales a los que se les hicieron modificaciones genéticas en sus receptores (*knock out* para los receptores D1 o D2).(122,123)

El sistema opioide

Los principales opioides endógenos son las encefalinas, la beta-endorfina, las dinorfinas A y B y la nociceptina (u orfanina FQ). Estos péptidos actúan a través de diferentes tipos de receptores: μ , delta, κ y el λ respectivamente.(125) El sistema opioide al ser influenciado por el alcohol participa en el control de la actividad dopaminérgica a nivel del sistema mesolímbico, vía de recompensa del cerebro. El alcohol activa los circuitos locales opiáceos de encefalinas del área del tectamento ventral por medio de los receptores μ y estimula las neuronas allí presentes, además incrementa las endorfinas en el núcleo *accumbens* con lo que aumenta la liberación de dopamina, contribuyendo tanto a la sensación de placer que produce el alcohol como al establecimiento y consolidación de los mecanismos de refuerzo del consumo. Sin embargo, no todos los receptores de opioides tienen esta respuesta. Al estimularse los receptores κ con agonistas, se inhibe la activación de neuronas dopaminérgicas. La activación agonista del receptor λ , inhibe las neuronas dopaminérgicas del área del tegmento ventral, disminuye la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* e impide la liberación del GABA inducido por el etanol en la amígdala central.(125–127)

La administración de antagonistas opioides reduce la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* inducida por etanol y se ha observado que el genotipo Asn40Asp del polimorfismo del gen OPRM1 parece estar relacionado con menos recaídas durante el tratamiento con el antagonista opiáceo naltrexona que los sujetos con genotipo Asn40Asn.(128)

El Sistema endocanabinoide

Los estudios publicados hasta ahora presentan fuertes evidencias sobre la participación del sistema endocanabinoide en la modulación de la respuesta aguda al etanol, el establecimiento de la tolerancia, dependencia, y la propensión a la recaída.(128,129)

Es un sistema al que pertenecen los neuromoduladores 2-araquidonil glicerol (2-AG) y N-arachidonylethanolamina (anandamida) derivados de lípidos que se sintetizan en la membrana post-sináptica de la neurona y que ejercen su influencia en los receptores cannabinoides (CB) ubicados en las membranas presinápticas; el receptor de tipo 1 (CB1) acoplado a proteínas G y principal receptor del sistema endocanabinoide, el receptor de tipo 2 (CB2) y el más recientemente descrito, el receptor huérfano GPR55. (23,38)

Los endocannabinoides son mensajeros químicos que median la señalización de forma retrógrada en los tejidos neuronales, uniéndose a receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) de la neurona presináptica, lo que a su vez causa un bloqueo en la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA. Los endocannabinoides interfieren de esta forma en el sistema de recompensa del etanol, el consumo y los procesos de abstinencia, así como en los mecanismos subyacentes a la recaída.(23, 28)

El CB1 está incrementado en áreas implicadas en la memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo), el control de la actividad motora (ganglios basales, cerebelo), en las emociones (amígdala), la percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula). CB1 contribuye a las propiedades de motivación y de refuerzo de etanol gracias a la liberación de endocannabinoides en el tectamento ventral anterior, que a su vez activa las neuronas dopaminérgicas.(38) El decremento en la liberación del GABA mediado por receptores CB1 produce una desinhibición de las neuronas dopaminérgicas.(23)

La ingesta aguda del etanol inhibe las neuronas del hipocampo por reducción en la liberación de glutamato mediada por la liberación de endocannabinoides. Si esto se extiende a las neuronas corticales entonces se esperaría que los endocannabinoides liberados por el consumo agudo de etanol redujeran también la respuesta cortical, produciendo un sinergismo con la actividad incrementada de la vía dopaminérgica mesolímbica.(23) De hecho, el consumo crónico de etanol conlleva a fenómenos de tolerancia debido a una mayor liberación de determinados endocannabinoides y una reducción en la expresión de CB1. La hiperexcitabilidad asociada durante la fase inicial de la abstinencia resulta en un aumento de la liberación endocannabinoides y en una reducción concomitantes en la expresión de CB1.(23)

El receptor CB2, en cambio, muestra una distribución más acotada que el receptor CB1 y parece estar implicado en la modulación de la respuesta inmune por el sistema endocannabinoide.

Los opioides endógenos podrían estar implicados en la activación del sistema cannabinoide cerebral y el incremento en el consumo de alcohol. La activación de los

receptores cannabinoideos estimula la liberación de opioides endógenos y a su vez , un incremento en el consumo de alcohol, situación que puede ayudar a los mecanismos de condicionamiento.(38) Por otro lado se ha visto que la señalización endocannabinoide deficiente en la amígdala central contribuye al comportamiento similar a la ansiedad relacionado con la dependencia y el consumo excesivo de alcohol(130)

Los agonistas del receptor CB1, inducen un incremento del consumo de alcohol en las ratas de laboratorio.(131) El rimonabant, antagonista del receptor canabinoide CB1, bloquea la capacidad del alcohol para inducir liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* produciendo una disminución del consumo de alcohol en los animales adiestrados para beber alcohol, además, bloquea la capacidad de los estímulos condicionados para producir recaídas y su consumo no genera síntomas de abstinencia del alcohol.(23,131–133).

El sistema serotoninérgico

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) está implicada en las acciones agudas y crónicas del consumo de alcohol y quizás en el desarrollo y en el mantenimiento de la dependencia.(41) Es un neurotransmisor que está implicado en varias funciones cerebrales como la regulación de estados afectivos, del sueño, aprendizaje, memoria y también se encuentra involucrado en las adicciones. Las vías serotoninérgicas se originan en los núcleos del rafe (fuente principal de serotonina en el cerebro), situados en el tallo cerebral y se proyectan a numerosas áreas corticales y subcorticales del cerebro donde hacen sinapsis con células dopaminérgicas, por lo que este sistema parece implicado en los efectos de recompensa del alcohol.(61) La neurotransmisión serotoninérgica y su receptor ionotrópico 5-HT₃, situado en las

terminales dopaminérgicas del núcleo accumbens, modulan la liberación de dopamina en dicho núcleo.(135)

El alcohol facilita la transmisión serotoninérgica debido a que es capaz de potenciar a los agonistas que se unen a los receptores 5-HT₃. Después del consumo agudo de alcohol aumentan los niveles extracelulares de serotonina en el núcleo *accumbens*, la corteza frontal, y el hipocampo ventral.(136) Con el consumo crónico se presenta un déficit en el líquido cefalorraquídeo del principal metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxi-indol-acético, así como una disminución en la disponibilidad de los transportadores de serotonina en el cerebro visto por SPECT,(41,134) y una disminución de los mismos en el núcleo caudado en estudios *postmortem*.(61) Todos estos déficits pueden representar un riesgo para desarrollar un consumo anormal de alcohol y con ello dependencia. (135)

En estudios con animales de laboratorio, el aumento de los niveles de serotonina conlleva un descenso del consumo de alcohol. Así, el bloqueo del receptor 5-HT₂ disminuyó el consumo de alcohol en los ratones; por otro lado, el bloqueo del receptor 5-HT₃ con medicamentos como el ondansetrón impide de forma selectiva tanto la liberación de dopamina inducida por el etanol en el núcleo *accumbens* como la liberación somatodentrítica de dopamina en el tectamento ventral anterior, llevando a una disminución subjetiva de los efectos placenteros del alcohol y a una disminución de su consumo en ratas.(138) Así mismo, estudios han demostrado que la deficiencia congénita de 5-HT conduce a un mayor consumo de etanol y una disminución de la sensibilidad a los efectos sedantes del mismo.(139) Estudios en humanos han evidenciado que medicamentos como el ondansetrón y los inhibidores selectivos de la

recaptación de la serotonina (ISRS) son útiles en alcohólicos según el momento del inicio del consumo (temprano o tardío) y según algunos patrones fenotípicos y genotípicos. (135,136-137)

El sistema noradrenérgico

La norepinefrina es una catecolamina derivada de la tirosina. Las neuronas sintetizadoras se localizan en el locus cerúleo y se proyectan a todas las regiones del cerebro. La norepinefrina está implicada en las reacciones de estrés y excitación.(53)

Existe un incremento en la transmisión noradrenérgica con dosis bajas de etanol, mientras que con dosis elevadas se ha visto una disminución de la misma.(61) En pacientes con síndrome de abstinencia los niveles de noradrenalina se incrementan en plasma y líquido cefalorraquídeo debido a la sobre estimulación de las neuronas noradrenérgicas al aumentarse la transmisión de glutamato y al perderse la autorregulación noradrenérgica por la disminución de la función de su receptor α_2 . (60,126)

La corticotropina

El factor liberador de corticotropina (FLC) juega un papel importante en el desarrollo de las recaídas dado que durante los periodos de abstinencia se producen respuestas de estrés y ansiedad, observándose niveles extracelulares de FLC en el núcleo central de la amígdala.(138,139) Se cree que el sistema de respuesta al estrés cerebral se activa por la ingesta excesiva de drogas como el alcohol, se sensibiliza durante los periodos de abstinencia, persistiendo durante la abstinencia prolongada, contribuyendo a la recaída inducida por el estrés que genera. (144)

En estudios realizados en ratas que preferían consumir alcohol, se evidencia un aumento en la liberación de corticotropina en estados donde experimentaban mayor ansiedad. Para mejorar los síntomas de ansiedad las ratas consumían repetidamente alcohol. (126,139,140)

FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON EL CONSUMO DE ALCOHOL

Los estudios realizados en familias que consumen alcohol muestran una relación de la genética con la dependencia del alcohol en torno al 55%, observándose que los hijos de padres dependientes tenían el doble de riesgo de padecerla por encima de otra patología psiquiátrica.(146) Los estudios realizados en hijos gemelos de familias consumidoras, señalan que la herencia en la dependencia alcohólica puede estar en el rango de 50-65% en ambos sexos.(147)

Múltiples genes se han visto implicados en el desarrollo de la dependencia alcohólica no explicada por una herencia de tipo mendeliana sino por diversas y complejas interacciones entre los genes y el ambiente. (95) Para la búsqueda de los genes implicados en la dependencia del alcohol se ha contado el análisis de estudios genéticos de asociación de polimorfismos y otras dos estrategias principales, por un lado, la realización de estudios de asociación genómica ampliada (GWAS del inglés *genome-wide association studies*) y por otro lado el abordaje mediante análisis de ligamiento genético.

Un polimorfismo genético es una variante del genoma originado por una mutación puntual, que se ha transmitido a la descendencia y que llega a adquirir una frecuencia superior al 1% en la población general tras varias generaciones. El

polimorfismo más frecuente es el denominado polimorfismo de único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*), en el que la mutación afecta a un solo nucleótido de la secuencia de ADN.(148) El análisis de genes candidatos mediante estudios genéticos de asociación se ha realizado ampliamente en la dependencia alcohólica y lo detallaremos posteriormente con especial énfasis en los polimorfismos de mayor interés en nuestro trabajo.

Estudios de asociación genómica ampliada

En estos estudios, se hace un análisis de todo el genoma de los individuos no emparentados que padecen la enfermedad de interés para identificar variantes genéticas comunes que expresen esa característica que se estudia. Se utilizan tecnologías de genotipado que analizan cientos de miles de polimorfismos. Con este tipo de análisis no se necesita tener una hipótesis de trabajo para iniciar la investigación, como sí se requiere en los estudios genéticos de asociación de polimorfismos o variantes genéticas concretas. (149–151)

Varios estudios publicados hasta la fecha se basan en los resultados de importantes estudios de asociación de genoma ampliado reconocidos en la literatura y que intentan encontrar la relación de la genética con la dependencia alcohólica.(151–153) Uno de los estudios más reconocidos es el estudio Colaborativo sobre la Genética del Alcoholismo (COGA), con un tamaño muestral de 2322 pacientes e iniciado en 1989 a través del *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA). Es un estudio genético multicéntrico donde se estudiaron familias con problemas de alcohol; su principal objetivo era identificar los genes que podrían contribuir a un aumento de la susceptibilidad por el consumo de alcohol y la relación con los diferentes fenotipos.

Demostó asociaciones altamente significativas entre la dependencia del alcohol y múltiples polimorfismos. (147,149)

Otro estudio colaborativo internacional, SAGE (*The Study of Addiction Genetics and Environment*), realizado por *The National Human Genome Research Institute* identificó en 2593 pacientes factores genéticos que contribuyen a la adicción a través de un estudio de asociación (casos y controles) del genoma en población europea – americana y africana. Los casos incluidos eran pacientes dependientes de alcohol según los criterios del DSM-IV.(151) Otro gran estudio fue realizado sobre el registro Australiano de Gemelos (*OZ-ALC cohort*) donde se analizaron a 8754 individuos, de los cuales 2062 eran dependientes del alcohol. Este estudio permitió concluir que existían cientos de variantes genéticas que a través de contribuciones modestas, estarían involucradas en el riesgo de consumo excesivo de alcohol.(153) En los últimos años se han publicado otros estudios de genoma ampliado y la búsqueda de asociaciones con dependencia alcohólica.(155–157)

Los genes y polimorfismos que se han identificado en mayor medida en estos estudios corresponden a las enzimas que metabolizan el alcohol: aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH2) y alcohol deshidrogenasa 1B (ADH1B); además, otros polimorfismos implicados en la transmisión neural de genes relacionados con la dependencia alcohólica se describen en los receptores de la dopamina, GABA, sistema glutamatérgico serotonina, entre otros.(146–148,153)

Análisis de ligamiento

Este tipo de estudios examinan la heredabilidad entre individuos emparentados. Los genes que tienen más probabilidad de heredarse juntos, son aquellos que se

encuentran muy cerca el uno del otro, en uno de los cromosomas de uno de los progenitores, debido al reordenamiento que ocurre durante el proceso de recombinación. Este tipo de análisis se realiza con el objetivo de identificar la ubicación de los genes de interés para la enfermedad. Se rastrea el genoma de los individuos procedentes de al menos dos generaciones de familias afectadas por el alcoholismo mediante marcadores genéticos polimórficos o micro satélites, intentando definir zonas compartidas por los individuos afectos. Al identificar las zonas se pueden encontrar cientos de genes y polimorfismos candidatos, por lo que dentro del análisis se suele tener en cuenta aquellos relacionados con la fisiología y bioquímica de la enfermedad o su vinculación con el tratamiento de la patología. Además, para poder identificar más claramente aquellos que realmente pueden ser responsables se suelen emplear estudios de asociación. El genotipado de los polimorfismos candidatos se realiza también en los genes de individuos control. A través de estudios de casos y controles se compara la frecuencia de los alelos en los dos grupos lo que permitirá dilucidar si ese polimorfismo en particular se encuentra relacionado con la patogénesis de la enfermedad. (94,154)

Una vez localizadas estas zonas (*locis*), se buscan los genes que tienen mayor probabilidad de estar implicados en la enfermedad para posteriormente realizar un análisis más exhaustivo mediante la secuenciación para la búsqueda de mutaciones y/o genotipado de polimorfismos.(142,155,156) Un ejemplo de ello, es que con este tipo de análisis se han descubierto *locis* en los cromosomas 1, 4 y 7. En el cromosoma 4, localizado en 4p, se ha situado al gen del receptor GABA-A y en la región 4q se encuentra el gen del alcohol deshidrogenasa. (84, 88–90,154)

Dada la complejidad de la patología del alcohol y de los mecanismos genéticos implicados en el mismo, a continuación se hará un breve resumen de los genes candidatos y sus polimorfismos que han motivado la realización de este trabajo de investigación.

POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y DEPENDENCIA ALCOHÓLICA

Polimorfismos del gen que codifica para el BDNF

El gen *BDNF* contiene 10 exones 5' no codificantes y un exón codificante. Dos polimorfismos del *BDNF* se han implicado en el desarrollo de la adicción al alcohol: la variante rs6265 (Val66Met) y el polimorfismo rs28383487 (C281A), situado antes del sitio de inicio de la traducción.

-Polimorfismo rs6265 (Val66Met o 196G>A): se produce una sustitución no sinónima en la posición 196 y un cambio en la secuencia proteica de Val a Met en el codón 66. Esta sustitución parece disminuir significativamente la producción y secreción de BDNF y también alterar la unión a su receptor TrkB.(65,76,160,161) Se ha observado su papel en el abuso de sustancias así como un amplio rango de trastornos psiquiátricos, déficits cognitivos y de comportamiento relacionado con la ansiedad.(167–170) El BDNF ejerce su influencia en la corteza media prefrontal, striatum, hipocampo y en el núcleo central y medial de la amígdala; como ya se ha señalado, cuando los niveles descienden, aumenta el consumo de alcohol.(61,71,76) Se ha implicado en cambios de la anatomía prefrontal e hipocampal y en su función.(171–173) Existen estudios con resultados contradictorios sobre la asociación de este SNP con la dependencia o abuso del alcohol.(169,170)

-Polimorfismo rs28383487 (C281A): este polimorfismo conduce a la reducción de la actividad promotora en las neuronas del hipocampo *in vitro*. Se ha estudiado en el contexto de trastornos de ansiedad(176) y en esquizofrenia paranoide donde parece que puede haber asociación en ciertas poblaciones.(177) No hay investigaciones hasta la fecha en el alcohol.

Polimorfismos del gen que codifica el NPY

Dentro de las variantes genéticas del gen que codifica para este neuropéptido, en este trabajo nos centraremos en:

-Polimorfismo rs16139 (Leu7Pro o 1128T>C): este polimorfismo afecta el procesamiento intracelular del pre-pro NPY y por ende la liberación de la forma madura de NPY.(178) El alelo menor se encuentra presente en un 6-15% de población caucásica y parece ausente en población oriental. Ha sido estudiado previamente por su asociación con el consumo de alcohol, la dependencia y los síntomas de abstinencia;(88,174,175) Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes,(173,176,177) aunque algunos estudios han encontrado que el alelo C es más frecuente en las personas dependientes del alcohol que en los controles.(88,174)

-Polimorfismo rs5573 (1258 G>A), fusionado con el rs9785023: este polimorfismo se ha estudiado muy poco en relación con los trastornos por uso de alcohol, pero se ha visto relación con la dependencia del alcohol e incremento en la ingesta del mismo en algunos estudios.(178,179) Hasta la fecha se desconoce el papel funcional que pudiera tener en la génesis de la dependencia alcohólica.

Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores GABA-A (GABRA):

Estudios genéticos y farmacológicos tanto en humanos como en animales han puesto en evidencia la posible relación que puede haber entre receptores GABA-A y el alcoholismo, dado su papel ya indicado en el desarrollo de tolerancia, dependencia y síntomas de abstinencia.(103,180–186) Los receptores GABA-A, como se ha mencionado, actúan en respuesta al GABA y otros agonistas e influyen en múltiples procesos cerebrales. (189)

Gen que codifica para la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA-A (GABRA1).

El gen *GABRA1* forma parte de un clúster de genes ubicados en la región 5q34. En combinación con otros genes (*GABRB2*, *GABRG2*), codifican el mayor subtipo de receptores presentes en el SNC, los $\alpha 1$. Su alteración está ligada a patologías como la dependencia del alcohol, la epilepsia o el estrés.(96,187,188) Así mismo, la exposición al etanol también causa una disminución de la transcripción de la subunidad $\alpha 1$, proceso en el que se cree que influyen, factores genéticos y epigenéticos.(100,189)

No es extraño por tanto que se haya investigado la variabilidad genética del *GABRA1* para valorar su implicación en la dependencia alcohólica. Así, los datos extraídos del estudio COGA, teniendo en cuenta los síntomas de dependencia incluidos en el DSM-III-R y los criterios de Feighner para la misma, encontraron asociación entre el gen *GABRA1* y diversos fenotipos como la dependencia del alcohol, historia de *blackouts*, edad en la que se presentaba la primera embriaguez, y el nivel de respuesta al alcohol.(195) Deleciones en subunidades de este gen pueden conllevar a la disminución de la acción del alcohol y otras drogas sedantes.(196) Por lo anterior merece la pena

prestar atención a distintos polimorfismos de este gen que pueden tener asociaciones con la dependencia alcohólica.

-Polimorfismo rs2279020: se ha descrito su asociación con el consumo de anfetaminas(197), epilepsia(198) y crisis de ausencia.(199) Está presente en la región intrónica y no conduce a un cambio de aminoácidos pero sí puede estar relacionado con la alteración de la conformación de proteínas maduras, al generar un *splicing* alternativo.(198) Este polimorfismo se ha asociado con alcoholismo en población asiática con un inicio del consumo a edades más tempranas y formas graves del alcoholismo.(183,184,195) Sin embargo, los resultados de otros estudios son contradictorios. (194,196)

-Polimorfismo rs1037715: se ha asociado con la esquizofrenia(202) y, en un menor número de estudios, se ha encontrado asociación con los niveles de respuesta al alcohol.(195)

Gen que codifica para la subunidad $\alpha 2$ del GABA-A (GABRA2)

Varios rastreos hlogenómicos (GWAS, de *genome wide association study*) señalan la relación de la dependencia del alcohol con el brazo corto del cromosoma 4, en una región que incluye un conjunto de subunidades del receptor GABA A.(146,159) Al realizar un mapeo más fino de esta región se encontraron numerosos polimorfismos en el gen *GABRA2* asociados con la dependencia del alcohol.(203–206) La subunidad $\alpha 2$ es la principal subunidad alfa en la región límbica y se encuentra principalmente en áreas de sinapsis.(202,203)

Por tanto, también *GABRA2* ha sido ampliamente investigado por su papel en el alcoholismo y la variación en la conducta de consumo,(209) la sensibilidad al alcohol,(210) y respuestas subjetivas como el rubor y los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas(211–213) entre otros fenotipos. También hay evidencia de su asociación con el comportamiento impulsivo(200,201) y el comportamiento agresivo relacionado con la dependencia, secundario al desbalance entre la actividad excitatoria glutamatérgica y la inhibición GABAérgica en el sistema límbico.(214–217) No se ha establecido aún, cómo la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA-A interacciona con la dependencia al alcohol, aunque algunos autores han especulado que se pueden presentar alteraciones en el funcionamiento del receptor debido a cambios en la transcripción o traducción del gen.(218) En adolescentes, la variación genética en *GABRA2* se ha asociado con diferencias individuales en la activación del núcleo *accumbens* durante la anticipación de incentivos, relacionado a su vez con los comportamientos de motivación específicos de la dopamina.(215). Entre los diferentes polimorfismos de este gen se encuentran:

-Polimorfismo rs279858: es el polimorfismo más ampliamente estudiado y el que más evidencia tiene de relación con la dependencia alcohólica y con los diferentes fenotipos y respuestas subjetivas relacionados con el consumo.(181,198,205,213–218) Se encuentra ubicado al lado de una de las regiones importantes relacionadas con la impulsividad y los problemas por el uso de alcohol a lo largo de la vida.(206) La variabilidad en este polimorfismo se ha relacionado con cambios en los niveles de RNAm de *GABRA2* en la corteza prefrontal en estudios realizados *post mortem* aunque

sin encontrarse diferencias en la expresión proteica entre alcohólicos y controles sanos.(218)

-Polimorfismo rs9291283: varios estudios en poblaciones europeas y estadounidenses han encontrado asociación del alelo C de este polimorfismo con la dependencia alcohólica.(199,219) Otros estudios en población caucásica no han podido verificar dicha asociación(225) o incluso han encontrado alguna relación pero a través de su alelo A.(226)

-Polimorfismo rs894269: pocos estudios han analizado este polimorfismo y su asociación con el alcoholismo. Los estudios iniciales en dependencia alcohólica no han hallado asociación.(203)

-Polimorfismo rs168697: no hay datos hasta la fecha de estudios en alcoholismo en nuestro conocimiento.

Gen que codifica para la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA-A (GABRA6).

Este receptor se expresa selectivamente en las células granulosas del cerebelo y las células de la cóclea vestibular. Resulta de interés para nuestro trabajo porque hay evidencia de que el cerebelo está involucrado en funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria, la resolución de problemas y la atención, así como en procesos patológicos, gracias a su conexión con áreas del cerebro relacionadas con la cognición y el comportamiento. También se ha asociado con desórdenes relacionados con la ansiedad.(222,223) El alcohol produce cambios en la expresión de RNAm de las subunidades α en el cerebelo observándose una regulación al alza de la subunidad $\alpha 6$ del *GABRA* después de un consumo crónico de etanol, a diferencia de lo que ocurre con

otras subunidades de este receptor en otras áreas del cerebro que disminuyen tras la exposición crónica, trayendo como consecuencia la disminución de la funcionalidad de su receptor y fomentando así los fenómenos relacionados con tolerancia y dependencia física. Mutaciones en la subunidad $\alpha 6$ podrían regular la expresión basal del gen, así como su expresión en el cerebelo modulada por el alcohol,(103) incrementando la sensibilidad al alcohol después de la exposición crónica.(229) Dentro de los polimorfismos en el gen *GABRA6* en el cromosoma 5q cabe mencionar:

-Polimorfismo rs3219151: se encuentra ubicado en la región no traducida 3' UTR, pero se ha descrito que podría alterar la fosforilación de la proteína y la actividad de sitios de unión al microRNA, regulando la estabilidad del RNAm y su traducción.(194:225) El microRNA tiene su papel en la expresión de los niveles del gen, desarrollo cerebral, programación epigenética y respuestas al estrés.(226,227) Además, por estar cerca de una región codificante podría alterar la expresión del propio *GABRA6* o de genes adyacentes.(189) Estudios previos realizados en diversas poblaciones han encontrado asociación con la dependencia alcohólica. (96,183,184,195,228,229) a través de su alelo T. Estos datos se han confirmado también en un meta-análisis. (199) Además se ha asociado el genotipo TT con inicio más temprano en el consumo, mayor ingesta de alcohol al día y mayor duración de la dependencia del alcohol.(189)

-Polimorfismo rs1992647: se ha estudiado en relación con trastornos depresivos y desórdenes relacionados con la ansiedad sin datos hasta la fecha de estudios realizados con el consumo de alcohol o sustancias de abuso.(222, 230)

-Polimorfismo rs2197414: en combinación con un haplotipo de este gen se ha relacionado con el trastorno bipolar, pero no hay estudios previos con el alcoholismo.(236)

Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores dopaminérgicos (DRD)

Dentro de las variantes genéticas del sistema dopaminérgico nos centraremos en ciertos polimorfismos de los genes que codifican para los receptores D1 (DRD1), D2 (DRD2) y D3 (DRD3).

El receptor D1 se expresa ampliamente en el estriado, en la corteza cerebral y en el bulbo olfatorio y es el principal punto de unión de la dopamina en la corteza prefrontal por lo que juega un importante papel en los procesos cognitivos y de trabajo de memoria.(237) Además, puede modular los eventos mediados por el receptor D2 a través de mecanismos sinérgicos entre D1 y D2 sensibles a la modulación glutamatérgica.(238) Está implicado en los efectos locomotores de las drogas de abuso y en los efectos de refuerzo y recompensa de las mismas. Una reducción del receptor D1 se asocia con una disminución del consumo de alcohol en ratas *knockout* para este gen (239) y su bloqueo se ha asociado con una disminución del comportamiento de búsqueda del mismo.(48,235) En estudios farmacológicos los resultados son controvertidos pues tanto el estímulo como el bloqueo de este pueden disminuir el consumo de alcohol en ratones. Cuando se administraron inyecciones locales de un agonista del receptor D1 en el núcleo *accumbens* o en el núcleo de la estría terminal, no se evidenció ningún efecto; sin embargo, la inyección de un antagonista en estas áreas redujo la autoadministración de alcohol en los ratones.(49) También se ha observado

que menor expresión de este receptor en áreas límbicas, caudado y putámen, hace que las ratas prefieran el consumo de alcohol, por lo que la ubicación del receptor y su susceptibilidad al alcohol podrían determinar el comportamiento frente al mismo.(49) Pocos estudios genéticos se han llevado a cabo con este receptor debido a la ausencia de un polimorfismo funcional identificable. Sin embargo, en algunos de ellos se han encontrado modestas asociaciones con la dependencia alcohólica y también se han identificado variantes genéticas que incrementan algunos scores de riesgo para rasgos de personalidad desinhibida en pacientes con dependencia alcohólica. (241)

- Polimorfismo rs4867798: esta variante se ha implicado en la asociación con el déficit de atención e hiperactividad. Se ha encontrado que el alelo C de este polimorfismo se asoció de forma significativa con mayor riesgo de desarrollo de alteraciones del comportamiento en los pacientes con enfermedad de Parkinson(242) e hiperactividad.(242) Pocos estudios han evaluado el polimorfismo en dependencia alcohólica sin encontrar relación significativa.(243)

El receptor D2: el RNAm de este receptor es menos abundante en las áreas corticales pero tiene una expresión amplia en los cuerpos celulares dopaminérgicos de la sustancia negra y área del tegmento ventral.(49) Este receptor se relaciona con la vía mesocortico- límbica, la cual está principalmente distribuida en el núcleo estriado.(244) Está presente tanto como autorreceptor presináptico como en el papel de receptor postsináptico. La activación dopaminérgica de los autorreceptores presinápticos disminuye la liberación y síntesis de dopamina y aumenta la recaptación de dopamina. Se sabe que la escasa unión al receptor D2 se asocia con aumento de los efectos de las drogas de refuerzo siendo la intensidad de este refuerzo proporcional a la liberación de

dopamina.(245) Así, el consumo crónico produce disminución del D2 en el núcleo estriado que puede predisponer a los procesos de adicción. En estudios con ratas a las que se les enseñó a auto-administrarse alcohol compulsivamente, se les aumentó artificialmente la densidad de receptores D2 observándose una disminución llamativa del consumo conforme los receptores iban aumentando y cuando los receptores volvían a los valores basales, el consumo compulsivo volvía a presentarse; por tanto, parece que en animales el aumento de este receptor protege contra la compulsión. (49) La disminución de los niveles de D2 en el estriado se asocia con una disminución del consumo de glucosa o una disminución del funcionamiento de la corteza frontal, principalmente el giro cingulado anterior dorsal y ventral (lo que genera conductas impulsivas) y en la corteza orbitofrontal (generando conductas compulsivas). (49) Por tanto, tras estas evidencias, la disminución de D2 en el sistema límbico conlleva a una mayor preferencia por consumo de alcohol.(50) Tras un periodo de abstinencia prolongado, debido a la disminución de la liberación de dopamina, se ha observado una disminución de la expresión e hipofunción de los D2 y de las vías dopaminérgicas, lo que explicaría síntomas como la anhedonia y falta de motivación que refieren los sujetos durante la abstinencia prolongada;(54,241,242) además, esa disminución de la disponibilidad de receptores D2 se asocia con un aumento del deseo de consumir alcohol (*craving*), conllevando a un mayor riesgo de recaída.

En estudios realizados con PET, tanto en humanos como en roedores, confirman esa disminución de estos receptores en el núcleo estriado en los abstinentes. Se ha visto que los hijos de padres dependientes del alcohol y que no consumen alcohol tienen aumentada la densidad del receptor D2 en el estriado en comparación con los que no

tienen antecedentes familiares de este trastorno, por lo cual los niveles más altos de estos receptores podrían proteger contra el desarrollo de la dependencia del alcohol.(243,244)

-Polimorfismo rs6277 (957C>T): se produce un cambio del alelo C por el T lo que genera una alteración en la estabilidad, síntesis y el potencial de unión del RNAm del gen.(245,246) Se ha relacionado con la funcionalidad del *DRD2*, la respuesta a la dopamina, y la dependencia al alcohol y otras sustancias. Un estudio realizado en múltiples familias caucásicas encontró una asociación del alelo T y la dependencia alcohólica, aunque no se pudo comprobar dicha asociación en un estudio de casos y controles.(252) Cuando se ha estudiado la funcionalidad de este polimorfismo mediante imágenes por PET, se ha visto que los individuos que presentan el alelo C tenían menor unión de la dopamina con su receptor D2 a nivel del estriado, en comparación con los controles que tenían el alelo T.(251) Sin embargo en estudios *in vitro*, se encontró asociado el alelo C con un aumento en la estabilidad del RNAm del *DRD2* y en la traducción de proteínas.(250) La disminución de la densidad de *DRD2* a nivel presináptico asociado con el genotipo CC de rs6277 podría conllevar a una disminución de la actividad del autorreceptor, lo que resultaría en aumento de la transmisión dopaminérgica y el aumento de recompensa de las drogas.(253) Un reciente estudio español no encontró asociación con la dependencia alcohólica. (243)

-Polimorfismo rs1799978 (585 A>G), (-241A/G): se ha encontrado dentro de los polimorfismos más frecuentes para predecir la respuesta al tratamiento con metadona en adictos a opioides.(254) Hasta la fecha no parece haber estudios efectuados en alcoholismo.

Polimorfismos del gen de la cinasa ankirina 1 (*ANKK1*, *ankyrin repeat and kinase-containing 1*).

Este gen está muy cercano al *DRD2* (11q23.1) y codifica una enzima que pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas que parece relacionarse con vías de transducción de señales y tiene un papel en las conductas relacionadas con el consumo de alcohol y el efecto reforzante.(255). Entre otras áreas, *ANKK1* se expresa en los astrocitos y se ha asociado con la red de atención ejecutiva en el giro cingulado anterior, una región rica en dopamina del cerebro. (239,251)

-Polimorfismo rs1800497 (Taq1A, C>T): este polimorfismo se creyó inicialmente que estaba en la región promotora del *DRD2* pero actualmente se localiza dentro de la región codificante del *ANKK1*. Este polimorfismo parece que tiene su papel en la regulación del sistema de la recompensa, en desórdenes del movimiento y psicosis.(257) En estudios poblacionales, este polimorfismo se ha asociado con incremento en la susceptibilidad para el desarrollo de adicción, y concretamente se ha asociado con la dependencia alcohólica principalmente a través de su alelo A1(T),(258–260) sin embargo, algunos resultados son controvertidos.(256,257) El alelo T se ha asociado con un decremento en la cantidad de receptor D2 en el núcleo estriado(258,259) y también, con un aumento de la actividad de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa, enzima final en la síntesis de dopamina en el estriado.(265)

En cuanto a la relación de este polimorfismo con el tratamiento del trastorno por uso de alcohol, un estudio farmacogenético encontró una disminución del deseo y ansiedad por el consumo de alcohol al suministrarse bromocriptina, un agonista pre-sináptico del receptor D2, a portadores del Taq1A. (266) La mejoría se observó sobre

todo en aquellos portadores del alelo A1 del polimorfismo TaqIA. Estudios *in vitro* han evidenciado de hecho un aumento en la expresión de *ANKK1* en astrocitos tras contacto con la apomorfina, agonista dopaminérgico.(267) Todo ello es consistente con que el alelo Taq1A altera el funcionamiento de *ANKK1*, la expresión de *DRD2* y la síntesis de dopamina.(265)

El receptor D3: este receptor se expresa principalmente en el área límbica, en las neuronas dopaminérgicas del núcleo *accumbens* donde actúa como auto-receptor liberador y regulador de dopamina,(263,264) en la sustancia nigra, globo pálido, tálamo e hipotálamo.(270–272) Parece estar relacionado con los aspectos cognitivos, motivacionales de los procesos de recompensa de la adicción, *craving* y recaída.(268,269) También se considera un marcador de adicción junto con los receptores D2 al estar disminuido en el cuerpo estriado. (272)

Polimorfismos del gen que codifica para este receptor se han asociado con el tabaquismo,(270,271) las ansias por el consumo de alcohol(274) y el trastorno depresivo mayor.(272) Estudios en laboratorio han reportado que su bloqueo reduce la recaída tras la presencia de señales condicionadas del alcohol.(273) Sin embargo, no está del todo claro su papel con el alcoholismo debido a que otros estudios no han podido confirmar su asociación con el consumo excesivo de alcohol. (238,272,273)

-Polimorfismo rs6280 (Ser9Gly, 25C>T): produce la sustitución de una serina por una glicina lo que parece genera auto-receptores D3 con una mayor afinidad por la dopamina y una señalización intracelular más robusta.(272) Se sabe que el alelo T (Gly) altera la afinidad de unión a la dopamina y puede, hasta cierto punto, influir en la función de este neurotransmisor.(279) Se ha estudiado su papel en varios trastornos

psiquiátricos y en la función ejecutiva.(280–283) Estudios previos realizados en población coreana, caucásica, entre ellos española, y en los indios, no han encontrado asociación con la dependencia alcohólica.(238,255, 272,273,279) Un estudio coreano, sin embargo, encontró relación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica en individuos con fenotipo Lesch tipo 1.(285)

OBJETIVOS

Objetivo general: verificar si los individuos poseedores de determinadas mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales en la neurobiología del alcoholismo presentaban asociación con la dependencia del alcohol, en comparación con individuos con abuso de esta sustancia, pero sin dependencia, y con voluntarios sanos.

Objetivos específicos:

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

A. Polimorfismos del BDNF

- Polimorfismo rs6265
- Polimorfismo rs28383487

B. Polimorfismos del NPY

- Polimorfismo rs16139

Polimorfismo rs9785023 (rs5573)

C. Polimorfismos de los GABRA

- Polimorfismo rs1037715 del *GABRA1*
- Polimorfismo rs2279020 del *GABRA1*
- Polimorfismo rs168697 del *GABRA2*

- Polimorfismo rs279858 del *GABRA2*
- Polimorfismo rs9291283 del *GABRA2*
- Polimorfismo rs894269 del *GABRA2*
- Polimorfismo rs3219151 del *GABRA6*
- Polimorfismo rs1992647 del *GABRA6*
- Polimorfismo rs2197414 del *GABRA6*

D. *Polimorfismos de los DRD:*

- Polimorfismo rs4867798 del *DRD1*
- Polimorfismo rs6277 del *DRD2*
- Polimorfismo rs1799978 del *DRD2*
- Polimorfismo rs1800497 del *ANKK1*
- Polimorfismo rs6280 del *DRD3*

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

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES

Se realizó un estudio de casos y controles, en el que se incluyeron 300 pacientes como casos, procedentes en su gran mayoría de la Unidad de Alcoholismo del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Salamanca o de la planta de hospitalización de dicho Servicio y de algunos casos del hospital Virgen de la Concha de Zamora y a su vez, referían un consumo de más de 100 g de alcohol/día durante un periodo de, al menos, 10 años. De ellos, 113 cumplían criterios de abuso de alcohol y 187 presentaban dependencia al consumo de alcohol, ambos trastornos definidos según la clasificación DSM-IV.(16)

El grupo control estaba formado por 157 voluntarios sanos, con un consumo inferior a 10 g de etanol/día, sin antecedentes psiquiátricos personales ni familiares, ni relacionados con el alcoholismo. Todos los pacientes y controles eran caucásicos y originarios de la comunidad autónoma de Castilla y León, así como sus ascendientes hasta el segundo grado. Ninguno de los individuos incluidos en el estudio, presentaba consumo activo de otras drogas, a excepción de nicotina. Se extrajo una muestra de 10 cc de sangre periférica, previo consentimiento informado, para su posterior procesamiento en el laboratorio, de acuerdo con las regulaciones legales para Estudios Clínicos en España, y la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DEL ADN

Obtención de células mononucleadas de sangre periférica

En tubos de EDTA, se realizó la recogida de sangre periférica, lisándose las células nucleadas mediante centrifugación durante 15 min a 1500 rpm a 4 ° de

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

Aislamiento del ADN total de alto peso molecular

El botón de células nucleadas de la sangre se re-suspendió en tampón Fornace a una concentración de 5×10^6 células/mL, con la adición de EDTA 0,5 M pH8 (concentración final 10 mM), quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; SDS (concentración final 1%), para romper las membranas celulares; y proteinasa K (concentración final 50 µg/mL), para degradar las proteínas. Durante 8-16 h, la mezcla resultante se incubó en baño a 55 °C

Purificación del ADN

Una vez terminada la incubación, se procedió a la extracción y purificación del ADN. Para ellos, se añadió al producto obtenido un volumen igual al suyo de la mezcla: fenol+cloroformo+alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló y centrifugó durante 10 min a 1800 rpm a 20 °C. La fase sobrenadante que contenía el ADN en solución se recogió, añadiéndose un volumen de CIAA (cloroformo + alcohol isoamílico 24:1), centrifugándose de nuevo con las mismas condiciones que en el paso previo. Se recuperó de nuevo la fase acuosa y se introdujo en un tubo con 2,5 volúmenes de etanol

absoluto frío, mezclándose por inversión hasta que apareció ADN, ya que el etanol absoluto hace que precipite. Se retiró y mezcló en un tubo Eppendorf con 500 µl de etanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se decantó. Finalmente, se lavó el ADN mediante la adición de etanol al 70% y una nueva centrifugación, y finalmente se resuspendió en ddH₂O estéril.

Amplificación del ADN

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real se llevó a cabo la amplificación del ADN; con esta técnica, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Esta técnica se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia. Durante la amplificación se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en todo momento, ya que es proporcional a la emisión de fluorescencia producida en la reacción, pudiendo así registrarse la cinética del proceso.(286)

Las sondas de hibridación específicas, fueron los sistemas de detección por fluorescencia que se utilizaron para llevar a cabo la discriminación alélica de todos los polimorfismos estudiados, *TaqMan MGB*® (*Applied Biosystems*). Estas sondas son oligonucleótidos que hibridan específicamente, marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, tras absorber energía y que al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia y por otro lado se tiene un aceptor o *quencher* en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor. Se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia, conocida por las siglas FRET (del inglés

fluorescence resonance energy transfer) entre las dos moléculas. Ambos fluorocromos deben estar espacialmente próximos para que este proceso se lleve a cabo y el espectro de emisión del donador se ha de solapar con el espectro de absorción del *quencher*.(286)

Mientras la sonda está intacta y los fluorocromos están cercanos, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación del ADN, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. La ADN polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, y al toparse con la sonda, mediante su actividad 5' exonucleasa, la hidroliza, liberando el fluorocromo donador. La fluorescencia emitida por el donador es captada por el lector (figura 2), al producirse la separación de los fluorocromos. Los fluorocromos usados para la discriminación alélica fueron VIC y FAM, con un espectro de excitación de 528 nm y 492 nm, y de emisión de 546 y 515 nm respectivamente.

Los equipos para llevar a cabo la PCR a tiempo real están compuestos por un termociclador y un lector de fluorescencia. Pueden efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales estudiados en ese momento, y en cualquier momento de la reacción. Se utilizó el equipo *StepOnePlus®* (*Applied Biosystems®*), que dispone de varios canales de lectura, permitiendo así la utilización de varias sondas marcadas con distintos fluorocromos en una misma reacción, para el estudio de genes diferentes. Las condiciones experimentales fueron las mismas para el estudio de todos los polimorfismos, con la excepción de las sondas específicas utilizadas en cada uno de ellos.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ L, que contenía 5 μ L del compuesto comercial *TaqMan® Universal PCR Master Mix No*

AmpErase® *UNG*, 0,25 μ L de la sonda específica para el polimorfismo estudiado, 4,25 μ L de agua estéril y 0,5 μ L del DNA.

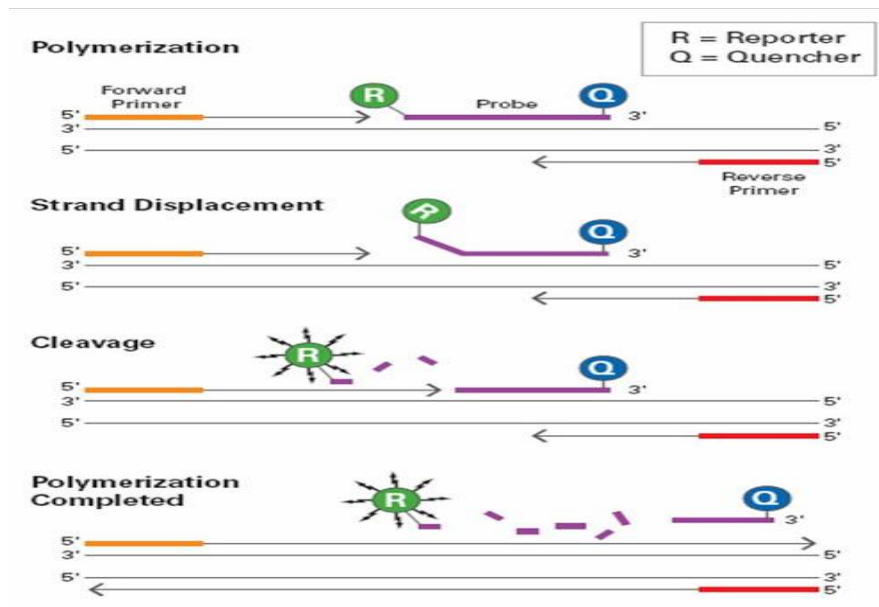


Figura 1. Mecanismo de una sonda TaqMan.<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45589825>

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

A: tramo de pre-PCR: 60 °C; 30 segundos

B: desnaturalización inicial: 95 °C; 10 minutos

C: desnaturalización: 95 °C; 15 segundos.

D: anillamiento y elongación: 60 °C; 1 minuto

E: elongación final, 60 °C; 30 segundos.

POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

Los polimorfismos analizados en este estudio se han nombrado de acuerdo al número de identificación (rs#) del polimorfismo en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Se hizo la mención también de su denominación habitual en la literatura, la cual está basada en la posición de la variante alélica en el gen con respecto al punto de inicio de la transcripción, siempre que estuviera disponible.

Polimorfismos del gen que codifica para el Factor neurotrópico derivado del cerebro (*BDNF*)

Se han estudiado dos polimorfismos de este gen

-*Polimorfismo rs6265 (Val66Met)*: localizado en la región 3`terminal del gen *BDNF*, en la secuencia pro-*BDNF* 50, dando como resultado una sustitución no sinónima en la posición 196 y un cambio en la secuencia proteica de Val a Met en el codón 66

-*Polimorfismo rs28383487 (C281A)*: es una variación que se produce en el cromosoma 11 de un nucleótido C por uno A en la posición +281.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de las sondas VIC y FAM usadas para la determinación del polimorfismo del gen del BDNF

Polimorfismo rs6265
Referencia C_11592758_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[C]GTGTTTCGAAAGTGTCAGCCAATGAT
FAM TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[T]GTGTTTCGAAAGTGTCAGCCAATGAT
Polimorfismo rs28383487
Referencia C_59752095_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CTTGTCAGGCTAGGGCGGGAAGACC[G]CTGGGGAAGTTGTTGCTTATCAGCG
FAM CTTGTCAGGCTAGGGCGGGAAGACC[T]CTGGGGAAGTTGTTGCTTATCAGCG

Polimorfismos del gen del Neuropéptido Y (NPY)

Se han estudiado dos polimorfismos de este gen

-*Polimorfismo rs16139 (T1128C)*: se produce una sustitución de un aminoácido de lisina por una prolina en el cromosoma 7 (Leu7Pro).

-Polimorfismo rs9785023 (1258 G>A): se presenta tras una sustitución de un nucleótido A por uno G.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 8.

Tabla 8. Secuencias de la sondas VIC y FAM usadas para la determinación del polimorfismo del NPY

Polimorfismo rs16139
Referencia C_11164473_20
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CTGCAGATGCTAGGTAACAAGCGAC[C]GGGGCTGTCCGACTGACCCTCGCC
FAM CTGCAGATGCTAGGTAACAAGCGAC[T]GGGGCTGTCCGACTGACCCTCGCC
Polimorfismo rs9785023 (rs5573)
Referencia C_11164468_1_
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CGGAGGACATGGCCAGATACTACTC[A]GCGCTGCGACACTACATCAACCTCA
FAM CGGAGGACATGGCCAGATACTACTC[G]GCGCTGCGACACTACATCAACCTCA

Polimorfismos de los genes de los receptores del sistema del ácido gama amino butírico A subunidad alfa (*GABRA*)

GABRA 1: se han estudiado dos polimorfismos de este gen.

-*Polimorfismo rs1037715*: es el resultado de la substitución de un nucleótido C por uno T en el gen *GABRA1*

-*Polimorfismo rs2279020*: resultado del cambio de un nucleótido A por uno G en el intrón 10 del cromosoma 5.

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

Tabla 9. Secuencias de las sondas VIC y FAM usadas para determinación de los polimorfismos del gen *GABRA1*

Polimorfismo rs1037715
Referencia C_1667770_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CATT TTTCTTAAATTTGGATCACTT C CTTCTTTTCAAATGACCTTAAAGAT
FAM CATT TTTCTTAAATTTGGATCACTT T CTTCTTTTCAAATGACCTTAAAGAT
Polimorfismo rs2279020

Referencia C_15966883_10

Secuencia de las sondas VIC/FAM

VIC TTCCAGAAAAGGTAAATGCTTTAAT[A]GTCACTGTAGTACATCAATATTATG

FAM TTCCAGAAAAGGTAAATGCTTTAAT[G]GTCACTGTAGTACATCAATATTATG

GABRA 2: se han analizado 4 polimorfismos

-*Polimorfismo rs168697*: se produce tras una sustitución de un nucleótido A por uno G en el cromosoma 4 en la región 3'UTR

-*Polimorfismo rs279858*: se produce por el cambio de un nucleótido A por uno G (K132K) ubicado en el cromosoma 4, *locus* p12 en el exón 4 del gen del *GABRA2*.

Polimorfismo rs9291283: es la variación de un nucleótido A por uno G en el cromosoma 4.

-*Polimorfismo rs894269*: es el resultado de la variación de un nucleótido C por uno T en el cromosoma 4, *locus* p12.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencias de las sondas VIC y FAM usadas para la determinación de los polimorfismos del *GABRA2*

Polimorfismo rs168697
Referencia C_3099144_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC TGAAATGCATTTTCATACCTACTAGC[A]GTCATGTACAATATATATATATACA
FAM TGAAATGCATTTTCATACCTACTAGC[G]GTCATGTACAATATATATATATACA
Polimorfismo rs279858
Referencia C_2073557_1
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC TTGTCATATTATGAGCTACTGATTT[C]TTCCATTGTGAAAAAAGGTATCTG
FAM TTGTCATATTATGAGCTACTGATTT[T]TTCCATTGTGAAAAAAGGTATCTG
Polimorfismo rs9291283
Referencia C_8262290_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM

VIC TTAGAGTTATATTAATATAGTAAC[A]GGAGATTTGTTCCAAAGGAAATGTG
FAM TTAGAGTTATATTAATATAGTAAC[G]GGAGATTTGTTCCAAAGGAAATGTG
Polimorfismo rs894269
Referencia C_8263129_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC ATATGTTACAACCTAAACAAACATT[C]GCTCTCTTATTTAGCTTGCTCTGTG
FAM ATATGTTACAACCTAAACAAACATT[T]GCTCTCTTATTTAGCTTGCTCTGTG

GABRA 6: se han estudiado 3 polimorfismos de este gen

-*Polimorfismo rs1992647:* se produce un cambio del alelo T por uno C. (A/G)

-*Polimorfismo rs2197414:* se produce un cambio del alelo C por uno G

-*Polimorfismo rs3219151:* se produce tras una sustitución del nucleótido C por uno T en la región no traducida (no codificante) 3'UTR del cromosoma 5q

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 11.

Tabla 11. Secuencias de la sondas VIC y FAM usadas para la determinación de los polimorfismos del gen *GABRA6*

Polimorfismo rs1992647
Referencia C_11275607_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CTCTGATGACACAAATCAGAGATGA[A]TGGTAAACATTTTCGATAGGAAAAAA
FAM CTCTGATGACACAAATCAGAGATGA[G]TGGTAAACATTTTCGATAGGAAAAAA
Polimorfismo rs2197414
Referencia C_1703387_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC CGAGGAACATTTTACTAAAGTTTGA[C]TGGTTTTATTCTAGAGCAAGTTTTTC
FAM CGAGGAACATTTTACTAAAGTTTGA[G]TGGTTTTATTCTAGAGCAAGTTTTTC
Polimorfismo rs3219151
Referencia C_11263956_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM

VIC AATTGGAAATCTGTAACGCAGCTTC[C]GTAAGCATGTGTGGGCAAAAAAGCA

FAM AATTGGAAATCTGTAACGCAGCTTC[T]GTAAGCATGTGTGGGCAAAAAAGCA

Polimorfismos de los genes de los receptores de dopamina (DRD)

DRD1: se ha estudiado un polimorfismo en este gen:

-*Polimorfismo rs4867798*: se produce por una sustitución del alelo C por un T en el cromosoma 5, ubicado en la región 3'-UTR del gen *DRD1* que parece afectar la estabilidad del RNAm y consecuentemente la expresión del *DRD1*. Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas para este polimorfismo se exponen en la siguiente tabla 12.

Tabla 12. Secuencias de las sondas VIC y FAM usados para el análisis del polimorfismo del gen DRD1

Polimorfismo rs4867798
Referencia C_3199279_10
Secuencias de las sondas VIC/FAM:
VIC: TTGAACACAGTAGTAGCTATACTTT[C]TTAAATTTTCAAATCTTTTCAGA
FAM: TTGAACACAGTAGTAGCTATACTTT[T]TTAAATTTTCAAATCTTTTCAGA

DRD2 y ANKK1: se han estudiado 3 polimorfismos para estos genes:

-Polimorfismo rs6277 (C957T): es el resultado del cambio del alelo T por un C en la posición +957 del cromosoma 11.

-Polimorfismo rs1799978: es el resultado del cambio de un alelo G por uno A en el cromosoma 11 en la posición -241 (-241A/G).

-Polimorfismo rs1800497 o TaqIA es un polimorfismo que se encuentra dentro de la región codificante de un gen vecino del DRD2, el ANKK1. Se produce la sustitución de un ácido glutámico por lisina en la serina/treonina kinasa, con lo cual puede afectar el sustrato de enlace al receptor D2.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en estos polimorfismos se exponen en la tabla 13.

Tabla 13. Secuencias de las sondas VIC y FAM usadas para la determinación de los polimorfismos del gen DRD2 y ANKK1

Polimorfismo rs6277
Referencia C_11339240_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC: TCTTCTCTGGTTTGGCGGGGCTGTC[A]GGAGTGCTGTGGAGACCATGGTGGG
FAM: TCTTCTCTGGTTTGGCGGGGCTGTC[G]GGAGTGCTGTGGAGACCATGGTGGG

Polimorfismo rs1799978
<p>Referencia C_7486599_20</p> <p>Secuencia de las sondas VIC/FAM</p> <p>VIC:GCGCTCCCACCCACACCCAGAGTAA[C]AAGCTGTGATTGCAGGCTGGGTCCT</p> <p>FAM:GCGCTCCCACCCACACCCAGAGTAA[T]AAGCTGTGATTGCAGGCTGGGTCCT</p>
Polimorfismo rs1800497
<p>Referencia C_7486676_10</p> <p>Secuencia de las sondas VIC/FAM</p> <p>VIC: CACAGCCATCCTCAAAGTGCTGGTC[A]AGGCAGGCGCCCAGCTGGACGTCCA</p> <p>FAM: CACAGCCATCCTCAAAGTGCTGGTC[G]AGGCAGGCGCCCAGCTGGACGTCCA</p>

DRD3: se ha estudiado un polimorfismo

-*Polimorfismo rs6280 (Ser9Gly)* es una mutación puntual en el cromosoma 3 que resulta en la sustitución de una glicina por una serina en la posición +9, en el receptor extracelular N-terminal de dominio.

Las secuencias de las sondas VIC y FAM empleadas en este polimorfismo se expone en la tabla 14.

Tabla 14. Secuencias de la sondas VIC y FAM usadas para la determinación del polimorfismo del gen DRD3

Polimorfismo rs6280
Referencia C_949770_10
Secuencia de las sondas VIC/FAM
VIC GCCCCACAGGTGTAGTTCAGGTGGC[C]ACTCAGCTGGCTCAGAGATGCCATA
FAM GCCCCACAGGTGTAGTTCAGGTGGC[T]ACTCAGCTGGCTCAGAGATGCCATA

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

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

Análisis estadístico de cada polimorfismo

Se evaluó en la muestra de controles, el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg por medio del test χ^2 , para cada polimorfismo estudiado. (148) La asociación

entre cada polimorfismo y la presencia de enfermedad se estudió mediante el test de la χ^2 , analizando la distribución de genotipos mediante tablas de 3x2, así como agrupando dichos datos en tablas 2x2 de frecuencia alélica y presencia alélica (comparando los portadores de un alelo frente al resto). Se utilizó el test exacto de Fisher si las frecuencias esperadas en las tablas de 2x2 eran menores de 5. Se realizó el análisis entre los grupos de alcohólicos y controles y se comparó también la distribución de las variantes genéticas estudiadas entre los alcohólicos dependientes y los abusadores. En los polimorfismos con una asociación significativa con la presencia de enfermedad en el análisis univariante, se analizó posteriormente cuál era el modelo de herencia que mejor explicaba el riesgo asociado con cada genotipo mediante análisis multivariante.

Los tres modelos de herencia estudiados fueron el modelo general, el recesivo y el dominante. En el modelo general la hipótesis de trabajo es que cada genotipo proporciona un riesgo diferente de padecer la enfermedad (a modo de ejemplo, para un polimorfismo A>G, cada posible genotipo AA, AG y GG proporciona un riesgo diferente). En el modelo dominante supone que una única copia del alelo es suficiente para modificar el riesgo para padecer la enfermedad (homocigotos GG y heterocigotos AG tendrían el mismo riesgo para el desarrollo de la enfermedad en un modelo dominante para el alelo G). En un modelo de herencia recesivo supone que son necesarias las dos copias de un alelo para modificar el riesgo (por lo que los genotipos AA y AG tienen el mismo riesgo, diferente de GG, en un modelo recesivo para el alelo G).(148) La dominancia de un alelo implica el carácter recesivo del otro. Este análisis se realizó mediante un modelo de regresión logística multivariante, introduciendo además las posibles variables de confusión. Siguiendo el ejemplo anterior, en el modelo de

herencia general los genotipos AA, AG y GG se codificaron para el análisis multivariante creando dos variables indicadoras (*dummy*), utilizando el genotipo AA como referencia. Para el modelo dominante para el alelo G, se agruparon los genotipos AG y GG en una variable, comparándolas con la variable de referencia que contenía la información del genotipo AA. Para el modelo recesivo, se agruparon los genotipos AA y AG en una variable, utilizándola como referencia para la comparación con el genotipo GG.

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

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

Cálculo de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

En los polimorfismos estudiados pertenecientes al mismo gen se estimó tanto el desequilibrio de ligamiento de los mismos como la frecuencia de los haplotipos y su posible relación con la enfermedad. El análisis de haplotipos se realizó mediante el método de estimación de máxima verosimilitud utilizando el algoritmo de expectación-maximización,(287) con lo que se obtiene la frecuencia de cada haplotipo y su OR en relación con el haplotipo de referencia. El cálculo del desequilibrio de ligamiento se

expresó mediante el coeficiente de Lewontin D' (LD), con un valor absoluto de 1 indicando desequilibrio completo y un valor de 0 correspondiente a ausencia del mismo. Estos cálculos se realizaron con el programa THESIAS (disponible en <http://www.genecanvas.org>) y para comprobar la precisión de la estimación de haplotipos, se realizaron también con el programa Haploview (disponible en <http://www.broadinstitute.org/sections/science/programs/medical-and-populationgenetics/haploview>)

Cálculo de la potencia estadística

El tamaño muestral de nuestro estudio (300 casos y 157 controles) nos permitió detectar con una potencia estadística del 83,5% un polimorfismo que conferiría una OR de 2 para la presencia de enfermedad, dada una frecuencia de dicho polimorfismo en el grupo control del 20%, y un nivel de significación α del 5%. Este cálculo se realizó con el programa PS: Power and Simple Size Calculations version 3.1.2, 2014 (disponible en <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize>).

RESULTADOS

RESULTADOS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ESTUDIADOS EN NUESTRO TRABAJO

La edad media y desviación estándar (DE) del grupo de pacientes ($n = 300$) con consumo excesivo de alcohol fue de 52,2 años (DE= 12,46), y la del grupo de controles ($n=157$) de 46,6 años (DE = 19,56), siendo esta diferencia significativa ($P = 0,002$). A su vez, también se halló una diferencia significativa ($P = 0,009$) entre la edad de los pacientes con historia de abuso de alcohol (55 años, DE = 14,93), y la de los pacientes dependientes (50,6 años, DE = 10,52).

A continuación se expondrán los resultados del análisis realizado de los diferentes polimorfismos en los pacientes, agrupados según cada gen analizado. Es importante mencionar que el número total de individuos genotipados puede variar ligeramente de un polimorfismo a otro debido a que no se continuó investigando el genotipado en algunos de ellos después de no haberlo conseguido en tres ocasiones.

Polimorfismos del *BDNF*

Polimorfismo rs6265

Las frecuencias genotípicas obtenidas al analizar este polimorfismo se muestran en la tabla 15. El alelo G fue el más frecuente en la muestra estudiada, de acuerdo a lo publicado en población europea. (283,284). Como se observa en dicha tabla 15., la distribución de genotipos entre los pacientes alcohólicos y los controles sanos, fue significativamente diferente ($P= 0,018$). La distribución genotípica de los controles cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2= 3,44$; $P = 0,064$).

Tabla 15. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs6265 del gen BDNF

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		GG	AG	AA
<i>Total</i>	457	275 (60,2%)	161 (35,2%)	21 (4,6%)
<i>Alcohólicos</i>	300 ^a	193 (64,3%)	92 (30,7%)	15 (5,0%)
- <i>Abuso</i>	113	78 (69,0%)	28 (24,8%)	7 (6,2%)
- <i>Dependencia</i>	187	115 (61,5%)	64 (34,2%)	8 (4,3%)
<i>Controles</i>	157 ^a	82 (52,2%)	69 (43,9%)	6 (3,8%)

Alcohólicos frente a controles ($P = 0,018$)

Esta diferencia se debe, como se aprecia en la tabla 16, a que la presencia del alelo A (genotipos GA y AA combinados) fue significativamente más frecuente en los controles (47,8%) que en los individuos alcohólicos (35,7%), OR = 0,61 (IC95%= 0,41 - 0,90). De igual manera, al comparar la presencia de este alelo A en el grupo de abusadores (31,0%) frente a los controles (47,8%) se encontró una mayor frecuencia en este segundo grupo, $P=0,006$; OR= 0,49 (IC95%= 0,30-0,81).

La distribución de frecuencias alélicas para el alelo A es diferente entre el grupo de abusadores y controles con una tendencia a la significación estadística (18,58% frente a 25,80%), $P= 0,045$; OR= 0,66 (IC95%=0,43-0,99).

Tabla 16. Distribución de los alelos del polimorfismo rs6265 del gen BDNF

Grupo (%)	Individuos	Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
		GG + GA	GA+ AA	Alelo G	Alelo A
Total	457	436 (95,4%)	182 (39,8%)	711 (77,78%)	343 (22,21)
Alcohólicos	300	285 (95,0%)	107 (35,7%) ^a	478 (79,66) ^b	122 (20,33)
Abuso	113	106 (93,8%)	35 (31,0%) ^b	184 (81,42)	42 (18,58) ^c
Dependencia	187	179 (95,7%)	72 (38,5%)	294 (78,61)	80 (21,39)
Controles	157	151 (96,2%)	75 (47,8%) ^{a,b}	233 (74,20)	81 (25,80%) ^c

^a. Portadores del alelo A en alcohólicos frente a controles: $P=0,012$; OR = 0,61 (IC95%=0,41-0,90).

^b Portadores alelo A en alcohólicos abusadores frente a controles, $P = 0,006$. OR 0,49 (IC95%, 0,45-0,81) ^c Frecuencia alélica A en alcohólicos abusadores frente a controles: $P=0,049$; OR=0.67

(IC95%=0,43-1,0).

En la tabla 17, se muestra el análisis de regresión logística ajustada por la edad de los genotipos distribuidos según los diferentes modelos de herencia. Los modelos significativos fueron el modelo general y el dominante. Entre estos dos modelos, el mejor ajuste se obtuvo para el modelo dominante, el cual presenta un menor criterio de información de Akaike (548,024) comparado con el modelo general (548,246). Por tanto, el modelo dominante es el que mejor explica nuestros resultados y nos indica que la posesión del alelo A (genotipos AA y GA) confería en nuestra población una OR=0,63 (IC95% = 0,42-0,94) para la presencia de alcoholismo (factor protector).

Tabla 17. Análisis de regresión logística de los genotipos del polimorfismo rs6265 del BDNF según los distintos modelos de herencia del alelo G en alcohólicos frente a controles.

<i>Análisis multivariante</i>					
Modelo para el alelo A	<i>Alcohólicos (%)</i>	<i>Controles (%)</i>	<i>OR ajustada*</i>	<i>IC 95%</i>	<i>p</i>
<i>General</i>					
GG	193 (64,3%)	82 (52,5%)	1	Referencia	
GA	92 (30,7%)	69 (43,9%)	0,58	0,38 - 0,88	0,011
AA	15 (5,0%)	6 (3,8%)	1,13	0,42 – 3,05	0,813
<i>Dominante</i>					
GG	193 (64,3%)	82 (52,5%)	1	Referencia	
GA+AA	107 (35,7%)	75 (47,8%)	0,63	0,42-0,94	0,024
<i>Recesivo</i>					
GG+GA	285 (95,0%)	151 (96,2%)	1	Referencia	
AA	15 (5,0%)	6 (3,8%)	1,39	0,52 – 3,69	0,515

*OR ajustada por la edad

Polimorfismo rs28383487

La distribución genotípica de los controles no cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg. $\chi^2=23,87$, $P\leq 0,001$. En todo caso, el análisis realizado mostró los resultados que se muestran en la Tabla 18, con diversos hallazgos significativos entre los grupos a comparar.

Tabla 18. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs28383487 del gen BDNF

Grupo	Individuos	Frecuencias genotípicas (%)		Frecuencias alélicas (%)	
		CC	CA	C	A
Total	465	313 (67,31 %)	136 (29,25 %)	762	136
Alcohólicos	304 ^a	246 (80,92 %)	49(16,12 %)	541(91,7% ^d	49(8,3%)
- Abuso	113 ^b	97 (85,84 %)	15 (13,27%)	243(94,2%) ^e	15 (5,8%)
- Dependencia	189 ^c	149 (78,84%)	34 (17,99%)	332(90,7%) ^f	34 (9,3%)
Controles	161 ^{a,b,c}	67 (41,61%)	89 (55,28%)	223(71,5%) ^{d,e,f}	89(28,5%)

a. Alcohólicos frente a controles $p\leq 0,001$; OR = 6,54 (IC95%=4,18-10,10).

b. Alcohólicos abusadores frente a controles $p\leq 0,001$. OR 8,40(IC95%= 4,47-15,77)

c. Alcohólicos dependientes frente a controles: $p\leq 0,001$; OR=5,68 (IC95%=3,48-9,26

d. Frecuencia alélica C en alcohólicos frente a controles: $p\leq 0,001$; OR=4,41 (IC95%=3,00-6,45).

e. Frecuencia alélica C en alcohólicos abusadores frente a controles: $p\leq 0,00$; OR=6,45(3,64-11,49).

f. Frecuencia alélica C en alcohólicos dependientes frente a controles: $p\leq 0,001$; OR=3,89 (IC95% 2,54-5,99)

Polimorfismos del *NPY*

Polimorfismo rs16139

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en la tabla 19, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre los diferentes grupos. La distribución genotípica de los controles cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 0,14$; $P = 0,71$).

La baja frecuencia del alelo menor C así como el no encontrar genotipo CC se corresponde con los resultados encontrados en otros estudios de población con ascendencia caucásica. (92,177,285)

Tabla 19. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs16139 del gen *NPY*

<i>Grupo</i>	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		<i>Frecuencias alélicas (%)</i>	
		<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
<i>Total</i>	453	425 (93,8%)	28 (6,2%)	878(96,9)	28(3,1)
<i>Alcohólicos</i>	296	277 (93,6%)	19 (6,4%)	573(96,8)	19(3,2)
- <i>Abuso</i>	114	107 (93,9%)	7 (6,1%)	221(96,9)	7(3,1)
- <i>Dependencia</i>	182	170 (93,4%)	12 (6,6%)	352(96,7)	12(3,3)
<i>Controles</i>	157	148 (94,3%)	9 (5,7%)	305(98,4)	9(2,9)

Polimorfismo rs9785023 (rs5573) 1258 G>A

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 20 y 21. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos o alelos entre los diferentes grupos estudiados. La frecuencia del alelo menor se correlaciona con lo publicado en la literatura. (291) La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 0,02$; $P = 0,88$).

Tabla 20. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs9785023 (rs5573) del gen NPY.

Grupo	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		AA	GA	GG
<i>Total</i>	456	108 (23,7%)	219 (48,0%)	129 (28,3%)
<i>Alcohólicos</i>	298	77 (25,8%)	140 (47,0%)	81 (27,2%)
- <i>Abuso</i>	114	25 (21,9%)	56 (49,1%)	33 (28,9%)
- <i>Dependencia</i>	184	52 (28,3%)	84 (45,7%)	48 (26,1%)
<i>Controles</i>	158	31 (19,6%)	79 (50,0%)	48 (30,4%)

Tabla 21. Distribución de los alelos del polimorfismo rs9785023 (rs5573) del gen NPY

Grupo	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica (%)</i>		<i>Frecuencias alélicas (%)</i>	
		GA+ GG	GA+ AA	<i>Alelo A</i>	<i>Alelo G</i>
<i>Total</i>	456	348 (76,3%)	327 (71,7%)	435 (47,7%)	477 (52,3%)
<i>Alcohólicos</i>	298	221 (74,2%)a	217 (72,8%)	294 (49,3%)	302 (50,7%)
- <i>Abuso</i>	114	89 (78,1%)	81 (71,1%)	106(47,0%)	122 (53,5%)
- <i>Dependencia</i>	184	132 (71,7%)	136 (73,9%)	188 (51,1%)	180 (48,9%)
<i>Controles</i>	158	127 (80,4%)	110 (69,6%)	141 (44,6%)	175 (55,4%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento analizado mediante el programa *Haploview*, entre los polimorfismos del gen *NPY* se muestran en la figura 3; el obtenido mediante el programa *THESIAS* estima un desequilibrio significativo entre rs16139 y rs5573 ($D' = -0.8$, $P < 0.001$).

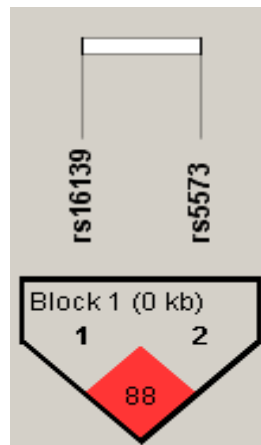


Figura 2. Desequilibrio de ligamiento (LD) de los polimorfismos estudiados del gen *NPY*. El número en el cuadrado rojo equivale a $|D'| \times 100$

La tabla 22, muestra los haplotipos que se predicen mediante el algoritmo de expectación-maximización de *THESIAS*; se obtuvieron 4 haplotipos, tres de los cuales presentaban una frecuencia superior al 1% en cada grupo. Utilizando el programa *THESIAS*, para el análisis de asociación de haplotipos, no se halló ningún resultado significativo para la asociación entre los casos y los controles. En el análisis de *Haploview* tampoco se encontró ningún haplotipo con relación significativa con el alcoholismo.

Tabla 22. Análisis de haplotipos en alcohólicos frente a controles para los polimorfismos del gen NPY

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia alcohólicos</i>	<i>Frecuencia controles</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>p</i>
AG	0,472	0,520	Referencia	-
AA	0,490	0,438	1,22 (0,92 – 1,62)	0,16
GG	0,033	0,040	0,93 (0,36 – 2,39)	0,88
GA	0,005	0,002	NC	
	<i>Frecuencia abuso</i>	<i>Frecuencia dependencia</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>p</i>
AG	0,454	0,505	0,82 (0,59 – 1,16)	0,26
AA	0,503	0,464	Referencia	-
GG	0,035	0,030	1,09 (0,38 – 3,10)	0,88
GA	0,008	0,0005	NC	

NC: no calculado por tener frecuencias muy bajas

Polimorfismos del gen de los receptores GABA (GABRA)

Polimorfismos del gen GABRA 1

Polimorfismo rs1037715

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 23 y 24. No se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos o alelos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3,156$; $P = 0,076$) y la frecuencia del alelo menor T se correlaciona con lo publicado en la literatura. (292)

Tabla 23. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs1037715 del GABRA 1

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	443	294 (66,4%)	123 (27,8%)	26 (5,9%)
<i>Alcohólicos</i>	290	190 (65,5%)	83 (28,6%)	17 (5,9%)
- <i>Abuso</i>	113	73 (64,6%)	33 (29,2%)	7 (6,2%)
- <i>Dependencia</i>	180	120 (66,7%)	50 (27,8%)	10 (5,6%)
<i>Controles</i>	150	101 (67,3%)	40 (26,7%)	9 (6,0%)

Tabla 24. Distribución de los alelos del polimorfismo rs1037715 del *GABRA 1*

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC + CT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	443	417 (94,1%)	149 (33,6%)	711 (80,2%)	175 (19,8%)
<i>Alcohólicos</i>	290	273 (94,1%)	100 (34,5%)	469 (80,9%)	117 (20,2%)
- <i>Abuso</i>	113	106 (93,8%)	40 (35,4%)	179 (79,2%)	47 (20,8%)
- <i>Dependencia</i>	180	170 (94,4%)	60 (33,3%)	290 (80,6%)	70 (19,4%)
<i>Controles</i>	150	141 (94,0%)	49 (32,7%)	242 (80,7%)	58 (19,3%)

Polimorfismo rs2279020

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 25 y 26. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos o alelos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,37$; $P = 0,544$) y la frecuencia del alelo menor G se correlaciona con lo publicado en la literatura.(293)

Tabla 25. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2279020 del *GABRA 1*

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>
<i>Total</i>	457	163 (35,7%)	220 (48,1%)	74 (16,2%)
<i>Alcohólicos</i>	294	107 (36,0%)	145 (48,8%)	45 (15,2%)
- <i>Abuso</i>	113	40 (35,4%)	50 (44,2%)	23 (20,4%)
- <i>Dependencia</i>	184	67 (36,4%)	95 (51,6%)	22 (12,0%)
<i>Controles</i>	160	56 (35,0%)	75 (46,9%)	29 (18,1%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento analizado mediante el programa *Haploview*, entre los polimorfismos del gen *GABRA1* se muestran en la figura 4. y el obtenido mediante el programa *THESIAS* estima un desequilibrio entre rs1037715 y rs2279020 de $D' = 0,84$ ($P < 0,001$).

Tabla 26. Distribución de los alelos del polimorfismo rs2279020 del GABRA1

Grupo (%)	Individuos	Presencia alélica		Frecuencias alélicas	
		AA + AG	AG+GG	Alelo A	Alelo G
Total	457	383 (83,8%)	294 (64,3%)	546 (59,7%)	368 (40,3%)
Alcohólicos	297	252 (84,8%)	190 (64,0%)	359 (60,4%)	235 (39,6%)
- Abuso	113	90 (79,6%)	73 (64,6%)	130 (57,5%)	96 (42,5%)
- Dependencia	184	162 (88,0%) ^a	117 (63,6%)	229 (62,2%)	139 (37,8%)
Controles	160	131 (81,9%)	104 (65,0%)	187 (58,4%)	133 (41,6%)

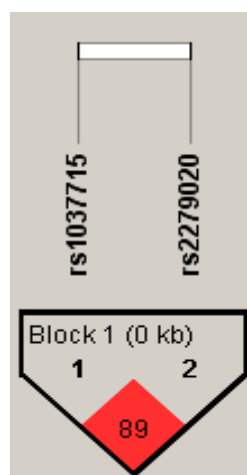


Figura 3 Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del gen GABRA1. Los números en los cuadrados equivalen a $|D' | \times 100$ y la ausencia de valor indica desequilibrio de ligamiento completo.

Mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se identificaron 4 haplotipos (Tabla 27), que presentaban frecuencias por encima del 1% en cada grupo. Utilizando este mismo programa para analizar la asociación de haplotipos, no se halló ningún resultado significativo para la asociación entre los dos grupos. En el análisis realizado con el programa Haploview para valorar dicha asociación tampoco se encontró significación estadística.

Tabla 27. Resultados del análisis de haplotipos en alcohólicos frente a controles y en dependencia frente a abuso para los polimorfismos del *GABRA 1*

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (alcohólicos)</i>	<i>Frecuencia (controles)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>p</i>
CA	0,58	0,57	Referencia	-
CG	0,21	0,22	0,94 (0,66 – 1,33)	0,71
TA	0,02	0,02	1,18 (0,39 – 3,54)	0,77
TG	0,18	0,19	0,92 (0,65 – 1,30)	0,64
<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (dependencia)</i>	<i>Frecuencia (abuso)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>p</i>
CA	0,60	0,55	Referencia	-
CG	0,20	0,24	0,77 (0,51 – 1,17)	0,23
TA	0,02	0,02	1,04 (0,28 – 3,80)	0,95
TG	0,18	0,19	0,88 (0,56 – 1,38)	0,57

Los polimorfismos dentro de cada haplotipo se presentan en el orden rs1037715 y rs2279020

Polimorfismos del gen GABRA2

Polimorfismo rs279858

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 28 y 29. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos o alelos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (χ^2 0,315; $p = 0,575$). La frecuencia de cada uno de los alelos es similar a la descrita en población caucásica. (294)

Tabla 28. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs279858) del GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	443	88 (19,9%)	205 (46,3%)	150 (33,9%)
<i>Alcohólicos</i>	294	63 (21,4%)	137 (46,6%)	94 (32,0%)
- <i>Abuso</i>	112	21 (18,8%)	57 (50,9%)	34 (30,4%)
- <i>Dependencia</i>	182	42 (23,1%)	80 (44,0%)	60 (33,0%)
<i>Controles</i>	149	25 (16,8%)	68 (45,6%)	56 (37,6%)

Tabla 29. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs279858) del GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC + CT</i>	<i>CT+ TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	443	293 (66,1%)	355 (80,1%)	381 (43,0%)	C 505 (57,0%)
<i>Alcohólicos</i>	294	200 (68,0%)	231 (78,6%)	263 (44,7%)	325 (55,3%)
- <i>Abuso</i>	112	78 (69,6%)	91 (81,3%)	99 (44,2%)	125 (55,8%)
- <i>Dependencia</i>	182	122 (67,0%)	140 (76,9%)	164 (45,1%)	200 (27,5%)
<i>Controles</i>	149	93 (62,4%)	124 (83,2%)	118 (39,6%)	180 (60,4%)

Polimorfismo rs168697

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en la tabla 30. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre los diferentes grupos estudiados y solo se encontraron resultados para genotipos AA y AG pero no para GG, lo cual se correlaciona con lo publicado en la literatura.(295) La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,142; $P= 0,706$) y la frecuencia del alelo menor G.

Tabla 30. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs168697) del GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		AA	AG	A	G
<i>Total</i>	446	413 (92,6%)	33 (7,4%)	859(96,3%)	33(3,7%)
<i>Alcohólicos</i>	295	271 (91,9%)	24 (8,1%)	566(95,9%)	24(4,1%)
- <i>Abuso</i>	112	103 (92,0%)	9 (8,0%)	216(96,4%)	9(4,0%)
- <i>Dependencia</i>	183	168 (91,8%)	15 (8,2%)	351(95,9%)	15(4,1%)
<i>Controles</i>	151	142 (94,0%)	9 (6,0%)	293(97,0%)	9(3,0%)

Polimorfismo rs9291283

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 31 y 32. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre los diferentes grupos estudiados.

Tabla 31. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs9291283) del GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		AA	AG	GG
<i>Total</i>	447	27 (6,0%)	172 (38,5%)	248 (55,5%)
<i>Alcohólicos a</i>	296	17 (5,7%)	117 (39,5%)	162 (54,7%)
- <i>Abuso</i>	113	5 (4,4%)	43 (38,1%)	65 (57,5%)
- <i>Dependencia</i>	183	12 (6,6%)	74 (40,4%)	97 (53,0%)
<i>Controles</i>	151	10 (6,6%)	55 (36,4%)	86 (57,0%)

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (χ^2 0,090; $P = 0,765$) y la frecuencia del alelo menor A se correlaciona con lo publicado en la literatura.(296)

Tabla 32. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs9291283) del GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>AA + AG</i>	<i>AG+GG</i>	<i>Alelo A</i>	<i>Alelo G</i>
<i>Total</i>	447	199 (44,5%)	420 (94,0%)	226 (25,3%)	668 (74,7%)
<i>Alcohólicos</i>	296	134 (45,3%)	279 (94,3%)	151 (25,5%)	441 (74,5%)
- <i>Abuso</i>	113	48 (42,7%)	108 (95,6%)	53 (23,5%)	173 (76,5%)
- <i>Dependencia</i>	183	86 (47,0%)	171 (93,4%)	98 (26,8%)	268 (73,2%)
<i>Controles</i>	151	65 (43,0%)	141 (93,4%)	75 (24,8%)	227 (75,2%)

Polimorfismo rs894269

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 33 y 34. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 3,703; $P = 0,054$) y la frecuencia del alelo menor T se correlaciona con lo publicado en la literatura.(297)

Tabla 33. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs894269) del gen GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	444	296 (66,7%)	123 (27,7%)	25 (5,6%)
<i>Alcohólicos</i>	293	193 (65,9%)	84 (28,7%)	16 (5,5%)
- <i>Abuso</i>	113	71 (62,8%)	33 (29,2%)	9 (8,0%)
- <i>Dependencia</i>	180	122 (67,8%)	51 (28,3%)	7 (3,9%)
<i>Controles</i>	151	103 (68,2%)	39 (25,8%)	9 (6,0%)

Tabla 34. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs894269) del gen GABRA2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC + CT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	444	419 (94,4%)	148 (33,3%)	715 (80,5%)	173 (19,5%)
<i>Alcohólicos</i>	293	277 (94,5%)	100 (34,1%)	470 (80,2%)	116 (19,8%)
- <i>Abuso</i>	113	104 (92,0%)	42 (37,2%)	175 (77,4%)	51 (22,6%)
- <i>Dependencia</i>	180	173 (96,1%)	58 (32,2%)	295 (81,9%)	65 (18,1%)
<i>Controles</i>	151	142 (94,0%)	48 (31,8%)	245 (81,1%)	57 (18,9%)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento analizado mediante el programa Haploview, entre los polimorfismos del gen GABRA2, se muestran en la figura 5, y el obtenido mediante el programa THESIAS se halla en la tabla 35., que estima un desequilibrio significativo entre rs1686697 y rs894269 ($D' = -0,14$, $P \leq 0,001$), entre

rs279858 y rs9291283 ($D' = 0,62$, $P \leq 0,001$) y entre rs9291283 y rs894269 ($D' = -0,92$, $P \leq 0,001$).

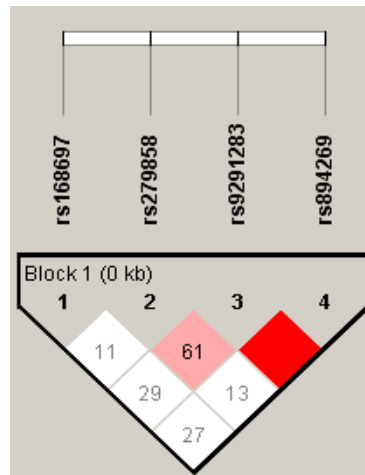


Figura 4 Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos indicados del *GABRA 2*. Los números en los cuadrados equivalen a $|D'| \times 100$ y la ausencia de valor indica desequilibrio de ligamiento completo.

Tabla 35. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos localizados en el *GABRA 2*

	rs1686697	rs279858	rs9291283	rs894269
rs1686697		-0,14	-0,38	0,42
rs279858	(P =0,376)		0,62	0,02
rs9291283	(P= 0,107)	(P \leq 0,001)		-0,92
rs894269	(P \leq 0,001)	(P=0,682)	(P \leq 0,001)	

Para cada par de polimorfismos, el valor D' que refleja el grado de DL se indica por encima de la diagonal de la tabla, mientras que el valor de "P" asociado figura en la parte inferior.

Mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se identificaron 13 haplotipos (tabla 36.), de los cuales 8 presentaban una frecuencia superior al 1% en

cada grupo. El haplotipo ATAC (correspondiente a los polimorfismos rs168697, rs279858, rs9291283, rs894269, por este orden) fue significativamente más frecuente en el grupo de controles que en el de pacientes alcohólicos , al compararlo con el haplotipo de referencia ATGC (OR 0,47 ; IC95%=0,23 – 0,97; $P=0,04$). Al comparar este hallazgo con lo calculado mediante el programa *Haploview*, en lo que se refiere a la asociación de este haplotipo con alcoholismo, no pudo demostrarse significación estadística.

Tabla 36. Resultados del análisis de haplotipos en alcohólicos frente a controles y pacientes con dependencia frente a aquellos con abuso para los polimorfismos del *GABRA 2*

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (alcohólicos)</i>	<i>Frecuencia (controles)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>p</i>
ATGC	0,395	0,384	Referencia	-
ACAC	0,208	0,165	1,30 (0,82 – 2,08)	0,27
ACGC	0,128	0,147	0,86 (0,54 – 1,34)	0,50
ATGT	0,085	0,099	0,83 (0,46 – 1,48)	0,52
ACGT	0,090	0,065	1,32 (0,70 – 2,46)	0,39
ATAC	0,042	0,079	0,47 (0,23 – 0,97)	0,04
GTGT	0,017	0,025	0,58 (0,18 – 1,83)	0,35
GTGC	0,012	0,010	1,19 (0,18 – 7,79)	0,85
GCAC	0,005	0,014	0,30 (0,04 – 2,38)	0,25
GCGT	0,009	0,005	1,96 (0,20- 19,64)	0,57

GCGC	0,005	0,003	1,21 (0,04- 41,31)	0,92
ACAT	0,003	0,002	NC	0,99
ATAT	0,0005	0,004	NC	
<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (dependencia)</i>	<i>Frecuencia (abuso)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>P</i>
ATGC	0,394	0,399	Referencia	-
ACAC	0,209	0,203	1,04 (0,64 – 1,70)	0,86
ACGC	0,131	0,123	1,08 (0,60 – 1,94)	0,79
ATGT	0,067	0,114	0,83 (0,46 – 1,48)	0,52
ACGT	0,091	0,088	0,61 (0,29 – 1,26)	0,18
ATAC	0,053	0,024	2,41 (0,74 – 7,79)	0,14
GTGT	0,021	0,008	0,59 (0,31 – 21,67)	0,38
GTGC	0,013	0,012	1,17 (0,15 – 9,00)	0,88
GCAC	0,003	0,008	NC	
GCGT	0,005	0,016	NC	
GCGC	0,006	0,004	NC	
ACAT	0,006	0,002	NC	

Los polimorfismos dentro de cada haplotipo se presentan en el orden rs168697, rs279858, rs9291283, rs894269. NC: no calculado

Polimorfismos del gen GABRA6

Polimorfismo rs2197414

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 37 y 38. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos y alelos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 3,140; $P=$ 0,535) y la frecuencia del alelo menor G se correlaciona con lo publicado en la literatura.(298)

Tabla 37. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs2197414) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		CC	CG	GG
<i>Total</i>	455	189 (41,5%)	198 (43,5%)	68 (14,9%)
<i>Alcohólicos</i>	301	129 (42,9%)	132 (43,9%)	40 (13,3%)
- <i>Abuso</i>	112	46 (41,1%)	53 (47,3%)	13 (11,6%)
- <i>Dependencia</i>	187	81 (43,3%)	79 (42,2%)	27 (14,4%)
<i>Controles</i>	154	60 (39,0%)	66 (42,9%)	28 (18,2%)

Tabla 38. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs2197414) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		CC + GC	GC+GG	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo G</i>
<i>Total</i>	455	387 (85,1%)	266 (58,5%)	576 (63,3%)	334 (36,7%)
<i>Alcohólicos</i>	301	261 (86,7%)	172 (57,1%)	390 (64,8%)	212 (35,2%)
- <i>Abuso</i>	112	99 (88,4%)	66 (58,9%)	145 (64,7%)	79 (35,3%)
- <i>Dependencia</i>	187	160 (85,6%)	106 (56,7%)	241 (64,4%)	133 (35,6%)
<i>Controles</i>	154	126 (81,8%)	94 (61,0%)	186 (60,4%)	122 (39,6%)

Polimorfismo rs1992647

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 39 y 40. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos y alelos entre los diferentes grupos estudiados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,996; $P=0,318$) y la frecuencia del alelo menor G se correlaciona con lo publicado en la literatura.(299)

Tabla 39. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs1992647) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		AA	AG	GG
<i>Total</i>	458	197 (43,0%)	195 (42,6%)	66 (14,4%)
<i>Alcohólicos a</i>	300	134 (44,7%)	126 (42,0%)	40 (13,3%)
- <i>Abuso</i>	111	48 (43,2%)	49 (44,1%)	14 (12,6%)
- <i>Dependencia</i>	187	84 (44,9%)	77 (41,2%)	26 (13,9%)
<i>Controles</i>	158	63 (3,9%)	69 (43,7%)	26 (16,5%)

Tabla 40. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs1992647) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>AA + AG</i>	<i>AG+GG</i>	<i>Alelo A</i>	<i>Alelo G</i>
<i>Total</i>	458	392 (85,6%)	261 (57,0%)	589 (64,3%)	327 (35,7%)
<i>Alcohólicos</i>	300	260(86,7%)	166 (55,3%)	394 (65,7%)	206 (34,3%)
- <i>Abuso</i>	111	97 (87,4%)	63 (56,8%)	145 (65,3%)	77 (34,7%)
- <i>Dependencia</i>	187	161 (86,1%)	103 (55,1%)	245 (65,5%)	129 (34,5%)
<i>Controles</i>	158	132 (83,5%)	95 (60,1%)	195 (61,7%)	121 (38,3%)

Polimorfismo rs3219151

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 41 y 42. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos evaluados, aunque se observó una tendencia hacia una diferente distribución diferente genotípica entre alcohólicos y controles ($P= 0,066$) como se observa en la tabla.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2 0,996$; $P= 0,318$) y la frecuencia del alelo menor C se correlaciona con lo publicado en la literatura.(300)

Tabla 41. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs3219151) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	436	96 (22,0%)	200 (45,9%)	140 (32,1%)
<i>Alcohólicos^a</i>	292	56 (19,2%)	134 (45,9%)	102 (34,9%)
- <i>Abuso</i>	112	20 (17,9%)	56 (50,0%)	36 (32,1%)
- <i>Dependencia</i>	178	36 (20,2%)	78 (43,8%)	64 (36,0%)
<i>Controles^a</i>	144	40 (27,8%)	66 (45,8%)	38 (26,4%)

^a.Alcohólicos frente a controles: $P= 0,066$

Como se muestra en la tabla 42., los pacientes alcohólicos presentaron significativamente mayor presencia del alelo T (genotipos CT y TT combinados) que los controles (80,8% frente a 72,2%), OR = 1,62 (IC95%=1,02 a 2,59); $P = 0,042$.

Se observó una distribución de la presencia alélica T diferente entre abusadores y controles (82,1% frente a 72,2%) sin alcanzar la significación estadística, $P= 0,06$, OR=1,77 (IC95%=0,97-3,24). La frecuencia alélica T fue también significativamente más frecuente en el grupo de alcohólicos frente a controles y en el grupo de dependencia frente a individuos sanos ($P =0,02$ y $0,03$, respectivamente).

Tabla 42. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs3219151) del GABRA 6

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC + CT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	436	296(67,9%)	340 (77,9%)	392 (45,0%)	480 (55,0%)
<i>Alcohólicos</i>	292	190 (65,1%)	236 (80,8%) ^a	246 (42,1%)	338 (57,9%) ^c
- <i>Abuso</i>	112	76 (67,9%)	92 (82,1%) ^b	96 (42,9%)	128 (57,1%)
- <i>Dependencia</i>	178	114 (64,0%)	142 (79,8%)	150 (42,1%)	206 (57,9%) ^d
<i>Controles</i>	144	106 (73,6%)	104 (72,2%) ^{a,b}	146 (50,7)	142(49,3%) ^{c,d}

^a Portadores del alelo T en alcohólicos frente a controles: $P=0,04$; OR = 1,62 (IC95%=1,02-2,59).

^b Portadores del alelo T en alcohólicos abusadores frente a controles: $P=0,06$; OR = 1,77 (IC95%=0,97-3,24).

^c Frecuencia alélica T en alcohólicos frente a controles: $p = 0,02$; OR = 1,41 (IC 95% = 1,06-1,88).

^d Frecuencia alélica T en alcohólicos con dependencia frente a controles: $p=0,03$; OR=1,41 (IC95%=1,03-1,93).

En el análisis de regresión logística de los genotipos distribuidos según los diferentes modelos de herencia para el alelo T (tabla 43.) se observó una tendencia a incrementar el riesgo de alcoholismo tanto en el modelo general como en el dominante aunque con una significación estadística que no superaba el límite del valor fijado.

En el modelo general, la posesión del genotipo TT incrementa en 1,74 las veces de desarrollar alcoholismo en relación con el genotipo establecido de referencia (CC), (IC95% 0,986 a 3,053), $p=0,056$.

En el modelo dominante la distribución del alelo T (genotipos CT+TT combinados) tiende a incrementar el desarrollo de alcoholismo en 1,61 veces (IC95%= 0,994 – 2,606); $p=0,05$.

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos analizados para el gen GABRA6, mediante el programa Haploview se observa en la figura 6., y el obtenido mediante el programa THESIAS se observa en la tabla 44, que estima un desequilibrio significativo entre *rs2197414* y *rs1992647* ($D'=0,89$, $P\leq 0,001$), entre los polimorfismos *rs1992647* y *rs3219151* ($D'=0,86$, $P\leq 0,001$) y entre *rs3219151* y *rs2197414* ($D'=0,90$, $P\leq 0,001$).

Tabla 43. Análisis de regresión logística de los genotipos del polimorfismo (rs3219151) del GABRA 6 según los distintos modelos de herencia del alelo T en alcohólicos vs controles.

Modelo para el alelo	Alcohólicos (%)	Controles (%)	<i>Análisis multivariante</i>		
			OR ajustada*	IC 95%	p
<i>General</i>					
CC	56 (19,2%)	40 (27,8%)	1	Referencia	
TT	102 (34,9%)	38 (26,4%)	1,74	1,00 - 3,053	0,056
CT	134 (45,9%)	66 (45,8%)	1,53	0,91 – 2,57	0,110
<i>Dominante</i>					
CC	102 (34,9%)	40 (27,8%)	1	Referencia	
CT + TT	236 (80,8%)	104 (72,2%)	1,61	1,00 – 2,61	0,053
<i>Recesivo</i>					
CT + CC	190 (65,1%)	106 (52,2%)	1	Referencia	
TT	102 (34,9%)	38 (26,4%)	1,31	0,83 – 2,07	0,240

* OR ajustada por la edad

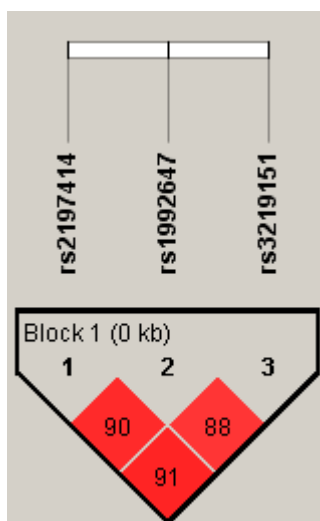


Figura 5. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen GABRA 6. Los números de los cuadrados equivale a $|D'| \times 100$ y la ausencia de valor indica desequilibrio de ligamiento completo.

Tabla 44. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos localizados en el GABRA 6

	rs2197414	rs1992647	rs3219151
rs2197414		0,89	0,90
Rs1992647	$(P \leq 0,001)$		0,86
rs3219151	$(P \leq 0,001)$	$(P \leq 0,001)$	

Para cada par de polimorfismos, el valor D' que refleja el grado de desequilibrio de ligamiento se indica por encima de la diagonal de la tabla, mientras que el valor de “ P ” asociado figura en la parte inferior.

Mediante el algoritmo de expectación-maximización de THESIAS, se identificaron 8 haplotipos, (tabla 45.). Como se puede observar en los 8 haplotipos de los casos se encontraron frecuencias por encima de 1%, mientras que para los controles solo se observa en 5.

El haplotipo GCC (correspondiente a los polimorfismos rs1992647- rs2197414 - rs3219151, por este orden) fue significativamente más frecuente en el grupo de controles (0,363) que en el de alcohólicos (0,301), al compararlo con el haplotipo de referencia CTT (frecuencia de 0,532 en alcohólicos y de 0,470 en controles), $p=0,04$; $OR=0,73$; $(IC95\%=0,54-0,99)$.

El haplotipo CTC (correspondiente a los polimorfismos rs1992647- rs2197414 - rs3219151, por este orden) también fue significativamente más frecuente en el grupo de controles (0,125) que en el de pacientes alcohólicos (0,081), $p=0,02$, $OR= 0,56$ ($IC95\%= 0,35 - 0,89$), al compararlo con CTT (frecuencia de 0,532 en alcohólicos y de 0,470 en controles).

Al comparar estos resultados con los extraídos con el programa *Haploview*, encontramos una asociación con diferentes haplotipos. Así, se observa que el haplotipo CAC es más frecuente en controles (0,120) que en los casos (0,081) con $P= 0,053$. Por otra parte el haplotipo CGT tiene mayor frecuencia entre los casos (0,023) que entre los controles ($<0,00$), ($P= 0,009$). Como estas frecuencias son muy bajas en el grupo control, por debajo de 1%, no es posible en nuestro caso sacar una conclusión completa al respecto.

Tabla 45. Resultados del análisis de haplotipos en alcohólicos frente a controles para los polimorfismos del GABRA 6.

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (alcohólicos)</i>	<i>Frecuencia (controles)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>P</i>
CTT	0,532	0,470	Referencia	-
GCC	0,301	0,363	0,73 (0,54 – 0,99)	0,04
CTC	0,081	0,125	0,56 (0,35 – 0,89)	0,02
GTC	0,032	0,014	1,73 (0,59 – 5,09)	0,32
GTT	0,011	0,007	1,22 (0,24 – 6,32)	0,81
CCC	0,011	0,003	3,02 (0,29 – 31,12)	0,35
CCT	0,023	0,003	5,64 (0,72 – 44,30)	0,10
GCT	0,011	0,014	0,69 (0,22 – 2,17)	0,52

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (Dependencia)</i>	<i>Frecuencia (Abuso)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>P</i>
CTT	0,521	0,541	Referencia	-
GCC	0,288	0,326	0,89 (0,62 – 1,29)	0,54
CTC	0,078	0,087	0,88 (0,46 – 1,64)	0,67
GTC	0,044	0,013	2,79 (0,70 – 11,09)	0,15
GTT	0,011	0,010	NC	
CCC	0,016	0,004	NC	

CCT	0,028	0,014	1,80 (0,63 – 5,10)	0,27
GCT	0,014	0,006	NC	

Los polimorfismos dentro de cada haplotipo se presentan en el orden rs2197414, rs1992647 y rs3219151). NC. No calculado

Polimorfismos de los genes que codifican para los receptores de dopamina (DRD)

Polimorfismos del gen DRD1:

Polimorfismo rs4867798

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 46 y 47. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes.

Tabla 46. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs4867798) del DRD1

Grupo (%)	Individuos	Frecuencias genotípicas (%)		
		TT	CT	CC
Total	430	212 (49,3%)	178 (41,4%)	40 (9,3%)
Alcohólicos	289	141 (48,8%)	120 (41,5%)	28 (9,7%)
- Abuso	111	51 (45,9%)	43 (38,7%)	17 (15,3%)
- Dependencia	178	90 (50,6%)	77 (43,3%)	11 (6,2%)

<i>Controles</i>	141	71 (50,4%)	58 (43,3%)	12 (8,5%)
------------------	-----	------------	------------	-----------

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,001, $P = 0,975$) y la frecuencia de los alelos se correlaciona con lo publicado en la literatura.(301)

Tabla 47. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs4867798) del *DRD1*

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>TT+CT</i>	<i>CT+CC</i>	<i>Alelo T</i>	<i>Alelo C</i>
<i>Total</i>	430	390 (90,7%)	218 (50,7%)	602 (70,0%)	258 (30,0%)
<i>Alcohólicos</i>	289	261 (84,7%)	148 (51,2%)	402 (69,6%)	176 (30,4%)
- <i>Abuso</i>	111	94 (84,7%)	60 (54,1%)	145 (65,3%)	77 (34,7%)
- <i>Dependencia</i>	178	167 (93,8%)	88 (49,4%)	257 (72,2%)	99 (27,8%)
<i>Controles</i>	141	129 (91,5%)	70 (49,6%)	200 (70,9%)	82 (33,9%)

Polimorfismos de los genes DRD2 y ANKK1:

Polimorfismo rs6277

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 48 y 49. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos evaluados

Tabla48. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs6277) del DRD2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>
<i>Total</i>	443	150 (33,9%)	221 (49,9%)	72 (16,3%)
<i>Alcohólicos a</i>	294	102 (34,7%)	146 (49,7%)	46 (15,6%)
- <i>Abuso</i>	113	39 (34,5%)	54 (47,8%)	20 (17,7%)
- <i>Dependencia</i>	181	63 (34,8%)	92 (50,8%)	26 (14,4%)
<i>Controles</i>	149	48 (32,2%)	75 (50,3%)	26 (17,4%)

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,390, $P=$ 0,532) y la frecuencia del alelo menor C se correlaciona con lo publicado en la literatura.(302)

Tabla49.Distribución de los alelos del polimorfismo (rs6277) del DRD2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>TT+CT</i>	<i>CT+CC</i>	<i>Alelo T</i>	<i>Alelo C</i>
<i>Total</i>	443	371 (83,7%)	293 (66,1%)	521 (58,8%)	365 (41,2%)
<i>Alcohólicos</i>	294	248 (84,4%)	192 (65,3%)	350 (59,5%)	238 (40,5%)
- <i>Abuso</i>	113	93 (82,3%)	74 (65,5%)	132 (58,4%)	94 (41,6%)
- <i>Dependencia</i>	181	155 (85,6%)	118 (65,2%)	218 (60,2%)	144 (39,8%)
<i>Controles</i>	149	123 (82,6%)	101 (67,8%)	171 (57,4%)	127 (42,6 %)

Polimorfismo rs1799978

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en la tabla 50. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos evaluados.

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,730 $P = 0,393$) y la frecuencia del alelo menor C se correlaciona con lo publicado en la literatura.(303)

Tabla 50. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs1799978) del DRD2

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		<i>Frecuencias alélicas (%)</i>	
		<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>
<i>Total</i>	429	395 (92,1%)	34 (7,9%)	824(96,0%)	34(4,0%)
<i>Alcohólicos</i>	281	258 (91,8%)	23 (8,2%)	539(95,9%)	23(16,5%)
- <i>Abuso</i>	113	103 (91,2%)	10 (8,8%)	216(95,6%)	10(4,4%)
- <i>Dependencia</i>	168	155 (92,3%)	13 (7,7%)	323(96,1%)	13(3,9%)
<i>Controles</i>	148	137 (92,6%)	11 (7,4%)	285(96,3%)	11(3,7%)

Polimorfismo rs1800497 (LYS 713 GLU)

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestran en las tablas 51 y 52. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos evaluados.

Tabla 51. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs1800497) del ANKK1

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	416	284 (68,3%)	119 (28,6%)	13 (3,1%)
<i>Alcohólicos</i>	277	192 (69,3%)	79 (28,5%)	6 (2,2%)
- <i>Abuso</i>	102	74 (72,5%)	25 (24,5%)	3 (2,9%)
- <i>Dependencia</i>	175	118 (67,4%)	54 (30,9%)	3 (1,7%)
<i>Controles</i>	139	92 (66,2%)	40 (28,8%)	7 (5,0%)

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 0,015, $P = 0,901$) y la frecuencia del alelo menor T se correlaciona con lo publicado en la literatura.(304)

Tabla 52. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs1800497) del ANKK1

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC+CT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	416	403 (96,9%)	132 (31,7%)	687 (82,6%)	145 (17,4%)
<i>Alcohólicos</i>	277	271 (97,8%)	85 (30,7%)	463 (83,6%)	91 (16,4%)
- <i>Abuso</i>	102	99 (97,1%)	28 (27,5%)	173 (84,8%)	31 (15,2%)
- <i>Dependencia</i>	175	172 (98,3%)	57 (32,6%)	290 (82,9%)	60 (17,1%)
<i>Controles</i>	139	132 (95,0%)	47 (33,8%)	224 (80,6%)	54 (19,4 %)

Análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento

El cálculo de desequilibrio de ligamiento, analizado mediante el programa Haploview, entre los polimorfismos analizados de los genes DRD2 y ANKK1 se muestra en la figura 6, y el obtenido mediante el programa THESIAS se halla en la tabla 53, que estima un desequilibrio significativo entre los polimorfismos rs1800497 y rs1799978 ($D'=-1,00$, $P \leq 0,001$), así como entre los polimorfismos rs6277 y 1799978 ($D'=0,11$, $P \leq 0,001$) y entre rs1800497 y rs6277 ($D'=0,11$, $P= 0,039$)

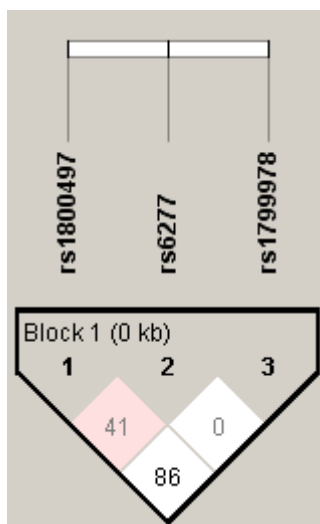


Figura 6. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de los genes DRD2 y ANKK1. Los números de los cuadrados equivale a $|D'| \times 100$ y la ausencia de valor indica desequilibrio de ligamiento completo.

Tabla 53. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del DRD2 y ANKK1

	rs1800497	rs6277	rs1799978
rs1800497		0,11	-1,00
rs6277	(P=0,039)		0,58
rs1799978	(P ≤0,001)	(P≤0,001)	

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

En la tabla 54., se muestran los haplotipos, mediante el algoritmo de expectación-maximización de *THESIAS*. Se hallaron seis haplotipos con frecuencia superior al 1% en ambos grupos, aunque sin diferencias significativas en la presencia de ninguno de estos haplotipos entre alcohólicos y controles. Al comparar los haplotipos en el grupo

de pacientes dependientes y abusadores se observa que el haplotipo CTG (rs1800497, rs6277, rs1799978 por este orden) fue significativamente más frecuente en el grupo de dependientes (0,07) que en los abusadores (0,022), al compararlo con el haplotipo de referencia CTA (frecuencia en dependientes de 0,449 y en abusadores de 0,478), $p=0,042$; $OR=3,62$ ($IC_{95\%}= 1,05 - 12,49$). En el análisis con el programa *Haploview* no se observó significación estadística para este haplotipo.

Tabla 48. Resultados del análisis de haplotipos en alcohólicos frente a controles para los polimorfismos de los genes DRD2 y ANKK1.

<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (alcohólicos)</i>	<i>Frecuencia (controles)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>P</i>
CTA	0,461	0,453	Referencia	-
CCA	0,255	0,275	0,90 (0,62 – 1,33)	0,61
TTA	0,113	0,098	1,15 (0,64 – 2,04)	0,65
TCA	0,100	0,103	0,96 (0,57 – 1,63)	0,89
CCG	0,051	0,057	0,85 (0,42 – 1,71)	0,65
CTG	0,019	0,014	1,45 (0,29-7,30)	0,65
<i>Haplotipo</i>	<i>Frecuencia (dependencia)</i>	<i>Frecuencia (abuso)</i>	<i>OR del haplotipo (IC 95%)</i>	<i>P</i>
CTA	0,449	0,478	Referencia	-
CCA	0,272	0,267	1,11 (0,70 – 1,74)	0,66
TTA	0,080	0,083	1,07 (0,48 – 2,40)	0,86
TCA	0,111	0,106	1,07 (0,55 – 2,06)	0,84

CCG	0,018	0,043	0,43 (0,12 – 1,59)	0,21
CTG	0,070	0,022	3,62 (1,05 – 12,49)	0,042

Los polimorfismos dentro de cada haplotipo se presentan en el orden rs1800497, rs6277, rs1799978.

Polimorfismo del gen DRD3:

Polimorfismo rs6280

Los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas analizadas para este polimorfismo se muestra en las tablas 55. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos evaluados, aunque cabe destacar que hay una tendencia hacia una distribución genotípica diferente entre alcohólicos y controles ($P= 0,069$).

Tabla 55. Distribución de los genotipos del polimorfismo (rs6280) del gen DRD3

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Frecuencias genotípicas (%)</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
<i>Total</i>	445	45 (10,1%)	209 (47,0%)	191 (42,9%)
<i>Alcohólicos^a</i>	295	27 (9,2%)	150 (50,8%)	118 (40,0%)
- <i>Abuso</i>	113	9 (8,0%)	63 (55,8%)	41 (36,3%)
- <i>Dependencia</i>	182	18 (9,9%)	87 (47,8%)	77 (42,3%)

Controles ^a	150	18 (12,0%)	59 (39,3%)	73 (48,7%)
------------------------	-----	------------	------------	------------

^aAlcohólicos frente a controles: X^2 5,344; $P=$ 0,069

La distribución genotípica de los controles de la muestra cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg (X^2 1,233, $P =$ 0,267) y la frecuencia del alelo menor C se correlaciona con lo reportado previamente.(305)

Tabla 56. Distribución de los alelos del polimorfismo (rs6280) del DRD3

Grupo (%)	<i>Individuos</i>	<i>Presencia alélica</i>		<i>Frecuencias alélicas</i>	
		<i>CC+CT</i>	<i>CT+TT</i>	<i>Alelo C</i>	<i>Alelo T</i>
<i>Total</i>	445	254 (57,1%)	400 (89,9%)	299(33,6%)	591(66,4%)
<i>Alcohólicos</i>	295	177 (60,0%)	268 (90,8%)	204(34,6%)	386(65,4%)
- <i>Abuso</i>	113	72 (63,7%)	104 (92,0%)	81(35,8%)	145(64,2%)
- <i>Dependencia</i>	182	105 (57,7%)	164 (90,1%)	123(33,8%)	241(66,2%)
<i>Controles</i>	150	77 (51,3%)	132 (88,0%)	95(31,7%)	205(68,3%)

DISCUSIÓN

El consumo excesivo de alcohol provoca una afectación multisistémica en diferentes órganos. Entre ellos, una de las más relevantes es la enfermedad conocida como trastorno por uso de alcohol y que implica la dependencia o adicción a esta sustancia. Existen diversos mecanismos por medios de los cuales el alcohol ejerce sus efectos en el cerebro conllevando la aparición de esta enfermedad. Muchos de estos mecanismos se han venido describiendo a lo largo de las últimas décadas y otros aún continúan en investigación. Existe evidencia al día de hoy, como ocurre con tantas otras enfermedades, de la relación entre múltiples factores medio ambientales y genéticos para el desarrollo de esta patología, dentro del esquema de herencia poligénica.

La implicación genética despierta gran interés a la hora de explicar los mecanismos para la predisposición, desarrollo de dependencia del alcohol, fisiopatología, evolución y el tratamiento de la misma. Sin duda alguna, el poder explicar distintas enfermedades desde el punto de vista genético ha permitido avanzar en el conocimiento de dianas terapéuticas para controlarlas.⁽⁷⁷⁾ Muchas enfermedades, especialmente las crónicas, se describen hoy en día en buena medida desde la genética y además el tratamiento de algunas de ellas se ve influenciado por la presencia o no de una determinada variante genética.

Debido al impacto socio-económico y en la salud pública, el alcoholismo ha estado en la mira de diversos estudios en todo el mundo con el fin de dar respuesta al interrogante “¿cómo puedo dejar de beber? “. Resulta interesante ver las diferentes respuestas frente a tratamientos de deshabituación entre los individuos afectados; para algunos les resulta más fácil dejar el consumo, en cambio para otros, resulta

prácticamente imposible; a su vez para algunos individuos la respuesta que genera el alcohol es de bienestar, mientras que para otros es de un fuerte rechazo.

Hallazgos a través de diversos estudios realizados alrededor del mundo, como por ejemplo el ya mencionado Estudio Colaborativo sobre la Genética del Alcoholismo (COGA), que ha entrevistado a más de 14000 personas y tomado muestras del ADN de 262 familias, han puesto en evidencia la participación de diferentes genes relacionados con el consumo de alcohol y a su vez han podido ver que diversos patrones de conducta frente al alcohol pueden ser el reflejo de variantes genéticas que afectan la neurobiología y con ello la susceptibilidad frente al mismo. Descubrir que estos patrones se pueden explicar a través de variantes genéticas y su interacción con el medio y a su vez promover el conocimiento genético de los individuos afectados o susceptibles, amplía el espectro de posibilidad de prevención y curación para aquellos que hasta ahora no les era posible con los fármacos habituales.

Por tanto ampliar el conocimiento de dichas variantes genéticas promoverá el avance de la farmacogenética y efectividad de los tratamientos en dichos individuos con un enfoque personalizado, teniendo en cuenta la presentación heterogénea de esta patología en los individuos adictos al alcohol.(77,306) Sobre la base de las alteraciones producidas por el alcohol, diferentes tratamientos farmacológicos ya están aprobados para contrarrestar el alcoholismo y otros están siendo estudiados en este momento. (77)

El presente trabajo intenta contribuir con este conocimiento, identificando variantes genéticas en genes específicos que están implicadas con el desarrollo de alcoholismo en una población española. Se han estudiado 18 variantes genéticas

localizadas en cuatro de los sistemas más importantes de la neurobiología del alcohol: el sistema dopaminérgico, el sistema del ácido gamma amino-butírico, el neuropéptido Y y el factor neurotrópico derivado cerebral. Se ha analizado la relación de estos con el abuso de alcohol y con el desarrollo de dependencia, estudiando cada polimorfismo de forma individual, valorando la relación con el cambio en un único *locus* y a través de la interacción de estos con otras variantes genéticas mediante análisis de *haplotipos*, debido a que estas interacciones pueden ser importantes a la hora de explicar la función de un gen.

Polimorfismo del gen BDNF

Al analizar el polimorfismo rs6265 en nuestra muestra se encontró que el alelo G se presentó más frecuentemente dentro de los casos de la muestra analizada, resultado similar al reportado previamente en población europea.(288) Por tanto, la presencia del alelo A fue más frecuente en los controles de nuestro estudio que en los individuos alcohólicos de forma significativa (47,8% frente a 35,7%, OR=0,63 (IC95%= 0,42-0,94), de forma que este alelo se asoció con menor frecuencia con la presencia de alcoholismo. De la misma forma y en otras palabras, el genotipo GG se presentó con mayor frecuencia en alcohólicos con respecto a controles de forma significativa, confiriendo riesgo para la presencia de alcoholismo (OR 1,58; IC95%= 1,11-2,44).

Este polimorfismo rs6265 se ha estudiado en las últimas décadas principalmente en el contexto de desórdenes neuropsiquiátricos,(302,303) entre ellos la dependencia a sustancias.(304,305) La asociación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica también ha sido objeto de estudios en comorbilidad con otras enfermedades psiquiátricas(306,307) y en menor medida, como único objetivo a investigar. (9-

10,165,310,311). Los resultados arrojados entre los diferentes estudios no siempre son consistentes a la hora de encontrar asociación, ni a la hora de definir el alelo que juega un papel en la patogenia. Incluso, los resultados llegan a ser contradictorios.(165,308,312) Sin embargo, se ha ido demostrando en estudios realizados en modelos animales y en humanos, el papel de este polimorfismo en la enfermedad, dado que el BDNF tiene un amplio campo de acción a nivel cerebral y múltiples dianas, con comportamientos diferentes dependiendo de la enfermedad estudiada, la comorbilidad, el sexo, inicio del consumo, factores medioambientales entre otros.(76,313–315) Así, este polimorfismo es capaz de alterar la secreción de BDNF o interferir en las vías de señalización del mismo y por tanto se entiende que pueda tener un papel importante en el desarrollo del alcoholismo dado el papel de esta proteína en esta enfermedad.(77)

La mayoría de estudios realizados con resultados positivos se han hecho en población asiática y dicha asociación se ha encontrado sobre todo con el alelo Met66(A).(165,308,316,317) En estas poblaciones, el alelo A se ha asociado con una menor expresión y actividad del BDNF y por tanto, podría conferir mayor riesgo para presentar diferentes enfermedades neuropsiquiátricas como por ejemplo el riesgo de desórdenes alimentarios, esquizofrenia, suicidio, depresión entre otras.(323) Así, se sabe que este alelo A en el hipocampo se asocia con una reducción en la expresión de proteínas BDNF y en la neurogénesis,(324) así como en una disminución del volumen del hipocampo y de la complejidad y configuración dendrítica. (76,313,318) El genotipo AA y los niveles disminuidos de BDNF se han relacionado por tanto en poblaciones asiáticas, al contrario que en nuestro estudio, con mayor riesgo de consumo crónico de

alcohol. (68,165, 169,320,321) Un estudio realizado en ratones aportó datos funcionales que apoyaban este resultado, dado que los ratones portadores del alelo A eran más propensos a desarrollar un consumo excesivo y compulsivo de alcohol, con lo cual, la función reducida de BDNF podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de fenotipos severos de abuso de alcohol, incluido el consumo compulsivo del mismo. Reforzando este hallazgo, al administrar una sustancia que contrarrestó el efecto del polimorfismo o al sobre expresar el alelo G, este consumo disminuyó. (77)

Por otra parte, estudios realizados en población caucásica presentan más controversia y muestran resultados dispares.(174) El estudio de Muschler y cols. y el de Nedic y cols., (169,170) realizados en población germana y croata respectivamente, no encontraron ninguna asociación del polimorfismo con la dependencia alcohólica. Otro estudio, realizado en población polaca encontró mayor riesgo de recaída tras tratamiento deshabitador en los portadores del alelo G, resultado que iría en la línea de nuestros resultados.(322) En la misma línea, un estudio más reciente, realizado, también en población polaca en pacientes con dependencia del alcohol según criterios DSM IV, encontró que aquellos portadores del genotipo Val66Val o GG de este polimorfismo rs6265 del gen BDNF presentaban mayor cantidad en el consumo de alcohol que los que no portaban este genotipo.(316)

Para intentar combinar los hallazgos de diferentes estudios, en el meta-análisis de Gratacos y cols.,(327) se observó que la posesión del genotipo AA o AG (Val66Met o Met66Met), combinados dada la baja frecuencia del alelo menor) de este polimorfismo confería un 21% de efecto protector en los desórdenes relacionados con abuso de sustancias con respecto al genotipo GG. A su vez, ese mismo análisis arrojó

que esos mismos genotipos podían incrementar el riesgo para los desórdenes alimentarios en un 33%. Sin embargo, y como hemos mencionado, estas conclusiones derivaron principalmente de estudios realizados en población asiática.

Una de las razones por las cuales los resultados son contradictorios es debido a la distribución alélica en las diferentes étnicas. Así, la frecuencia del alelo G (Val66) es más frecuente en población caucásica y A (Met66) es más frecuente en población asiática.(283,322) Como el alelo A ha sido ampliamente implicado en la dependencia del alcohol en población asiática, los estudios en población caucásica han intentado verificar la asociación de este alelo en el alcoholismo. Sin embargo, dado que el genotipo AA se observa en población caucásica solo en un 2-3% de la población, la mayoría de los estudios han comparado los portadores del alelo A (AG y AA) con los individuos homocigotos para el alelo G (GG), sin resultados concluyentes.(307)

Al igual que hemos mencionado que la posesión del genotipo AA presenta plausibilidad biológica para su asociación con trastornos psiquiátricos en población asiática, también existen datos que apoyarían la implicación del alelo G en estos trastornos. Por un lado, una hipótesis para explicar este hallazgo es que los portadores del alelo G muestran alta actividad dependiente de la secreción de BDNF desempeñando ello un factor de riesgo para el desarrollo de desórdenes neuropsiquiátricos como el trastorno bipolar y el abuso de sustancias, lo que hace también plausible la asociación encontrada en nuestro estudio.(311,322,323). Además, el gen BDNF posiblemente influye en los patrones de consumo de alcohol por su repercusión en diferentes vías de los neurotransmisores, entre ellos, una posible regulación del efecto dopaminérgico. La intoxicación por alcohol conduce a la

liberación de dopamina, lo que contribuye a los efectos gratificantes del alcohol en el sistema nervioso central.(316) Se ha reportado previamente, de hecho, que el genotipo GG de este polimorfismo rs6265 del *BDNF* está relacionado con un mejor funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas,(329) lo que podría conducir a una mayor liberación de dopamina después de la intoxicación por alcohol. Por otro lado, el consumo crónico de alcohol en sí mismo puede provocar interrupciones de la neurotransmisión de dopamina. Klimkiewicz y cols., encontraron cambios en el sistema dopaminérgico que podían estar potenciados cuando este polimorfismo se presentaba con otras variantes genéticas, como por ejemplo el polimorfismo Val158Met del gen *COMT* que también influye en la vía dopaminérgica, pudiendo contribuir e influir de forma positiva en el nivel de consumo de alcohol, en la motivación para beber y en la regulación del estado de ánimo. (316)

Parece razonable por tanto plantear que es preciso analizar este polimorfismo caracterizando y agrupando por etnicidad y otras características biológicas y fenotípicas similares para que los resultados puedan ser mejor reflejados y explicados. Nuestros pacientes no presentaban otra comorbilidad psiquiátrica según los criterios de inclusión y esa podría ser otra diferencia en los resultados obtenidos, dado que mucha de las asociaciones significativas que se han encontrado en este polimorfismo y el alcohol, están dentro de un contexto neurobiológico más complejo. Esto es entendible dado que el *BDNF* tiene una expresión amplia a nivel cerebral, diferentes respuestas según donde se ubique el receptor,(160,325) e interacción con otros genes que pueden modificar su expresión y su influencia sobre otros sistemas de neurotransmisores.(311,324) Así mismo, la edad de inicio del consumo de sustancias también puede influir, ya que a

menor edad se evidencian menos niveles de BDNF (319) y, además, su expresión se puede ver afectada por el estrés que pueda presentar el individuo en un momento puntual. Todo ello puede llevar a un aumento o disminución de la secreción del BDNF, que dificulta la interpretación del papel del alelo o que incluso haga que pueda comportarse en algunos casos como factor protector y en otros casos como factor de riesgo(313,314,326).

Polimorfismos del gen del NPY

No se encontraron resultados significativos al estudiar frecuencias alélicas o genotípicas entre los diferentes grupos evaluados de los polimorfismos rs16139 y rs9785023.

Con respecto al polimorfismo rs16139 del *NPY* no encontramos ningún tipo de asociación. En nuestra muestra, el alelo T fue predominante en la población analizada y el alelo C tenía muy baja frecuencia global (96,9% frente a 3,1%). No encontramos tampoco homocigotos para este alelo, tal como se referencia en estudios de población europea.(285,176,177)

Como se ha comentado previamente en la introducción, varios estudios en modelos animales han evidenciado el rol del NPY en la preferencia y consumo de alcohol, por ejemplo, niveles bajos del mismo elevan el nivel de consumo. (60,85,87, 89,90) Debido a ello este polimorfismo del *NPY* ha sido muy estudiado por su asociación con dependencia, consumo y síntomas de abstinencia. Así, el alelo Pro o C se ha encontrado con más frecuencia en alcohólicos que en controles sanos,(88,174,175) aunque los resultados no son concluyentes en los diferentes estudios realizados a nivel

poblacional. (173,176,177,327) Por tanto, no está claramente descrito el rol que juega este polimorfismo en la génesis o desarrollo del alcoholismo. Sí se ha descrito un cambio funcional asociado a este polimorfismo con una variación en los niveles plasmáticos del NPY(333) de forma que el genotipo CT tenían niveles significativamente más bajos en plasma de NPY que los individuos con genotipo TT.(334) Respecto al genotipo CC, casi no hay datos en la literatura de frecuencia del mismo.

Uno de los primeros estudios, hecho en población finlandesa por Kauhanen y cols.,(89) encontró que la posesión del alelo C se asociaba con un incremento en un 34% del consumo de alcohol con respecto al genotipo TT. Además, este alelo C se ha reportado con mayor frecuencia en individuos con inicio tardío de la dependencia del alcohol frente a aquellos que tienen un inicio temprano, en aquellos que presentan un mayor consumo diario, y también en personas dependientes del alcohol con delirium tremens o que hubieran experimentado abstinencia con convulsiones frente a personas dependientes del alcohol con síntomas más leves de abstinencia.(88,175,176) En contraposición, otro estudio dirigido por Ilveskoski,(335) que también pretendía demostrar la asociación del alelo C con la dependencia del alcohol, no encontró esa asociación y por el contrario evidenció protección para la presencia de dependencia del alcohol en alcohólicos tipo 2 de la clasificación de Cloninger que portaban este alelo, dado que los individuos alcohólicos tenían baja frecuencia de este alelo con respecto a los controles sanos; además, observó que su forma heterocigota era más común en bebedores sociales (controles del estudio) que en los alcohólicos, a diferencia de lo observado en el estudio de Kauhanen y cols.

Otros estudios en población caucásica no han encontrado diferencias significativas en la posesión del alelo C entre los individuos dependientes del alcohol y los controles de origen europeo o norteamericano (173,176,177,327). En población mediterránea española, se ha descrito por Portole y cols.,(336) una frecuencia extremadamente baja del alelo C (<1%). Lo mismo ocurre con lo encontrado en todos los grupos de nuestro estudio, donde la frecuencia total de los portadores del alelo C fue del 3,1%. Todo ello dificulta o imposibilita la confirmación o no de asociación estadística pues no permite descartar un error de tipo II dada la baja potencia. Un estudio realizado en la India, no encontró relación tampoco de este polimorfismo con el alcoholismo. En este estudio se compararon dos poblaciones diferentes, una de ellas con una frecuencia del alelo C en alcohólicos y controles de 25% y 19,3%, respectivamente, y otra con una frecuencia del alelo de 3% y 0,025%. No se encontró asociación estadística en ninguna de las poblaciones estudiadas.(183)

Desde el punto de vista biológico, es plausible que el alelo C de este polimorfismo esté relacionado con el consumo de alcohol debido a los hallazgos funcionales *in vitro* y los datos de algunos estudios poblacionales. Si bien es cierto que la baja frecuencia de este alelo podría estar contribuyendo a un error de tipo II que justifique la no significación en muchos estudios, también es cierto que podríamos encontrarnos ante un verdadero negativo y que no influya como se ha pensado en el desarrollo de la dependencia al alcohol.(336) También puede ocurrir, igual que en otras variantes genéticas, que su efecto dependa de otros factores presentes que potencien o no su acción. Los estudios apuntan a una influencia del NPY en el alcoholismo pero aún es necesario aclarar si el decremento de los niveles del NPY que se han observado en

los estudios estuvieron presentes antes del desarrollo del mismo, o son la consecuencia del consumo de alcohol como tal.(184) Sería interesante en futuros estudios valorar los niveles de NPY en sangre y/o líquido cefalorraquídeo en los pacientes alcohólicos y controles, en aquellos con antecedentes familiares y sin los mismos para valorar mejor el papel de este polimorfismo.

Al evaluar el polimorfismo rs5573/rs9785023, se observó mayor presencia alélica A en dependientes que en controles (51,5% vs 44,6%) o, de otra manera, se observó menor presencia del alelo G en los pacientes con dependencia de alcohol (71,7%) (Genotipos GA y GG) que en los controles (80,4%) aunque sin llegar a ser significativo, OR=0,62 (IC95% 0,37 - 1,03), $P=0,063$. Por tanto, no puede comprobarse claramente que la posesión del alelo G (genotipos GA y GG) confiera en nuestra población cierto grado de protección para la presencia de dependencia alcohólica.

Pocos estudios han analizado este polimorfismo y su relación con el alcohol. Un estudio realizado en población española mediterránea que valoró este polimorfismo en 911 individuos, encontró que genotipo recesivo AA del polimorfismo rs5573 (rs9785023) en comparación con la posesión del alelo G se relacionó con un incremento en la ingesta de alcohol, siendo esta asociación más relevante en aquellos individuos varones con elevado consumo de alcohol y en mujeres con consumo moderado (184) Otro estudio realizado en población india, encontró asociación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica, también a través del alelo A. En nuestro caso, existe una tendencia de una mayor presencia alélica A en individuos dependientes, que iría en consonancia con lo encontrado en el estudio mediterráneo español previo.(184) Hasta la fecha, no existen estudios que revelen el papel biológico y funcional de este

polimorfismo en la génesis de la dependencia y/o patrón de consumo y que puedan por tanto explicar los hallazgos que se han ido documentando en la literatura.

Análisis de haplotipos del NPY

Pocos estudio han realizado análisis de haplotipos, y se han reportado en poblaciones donde existe una mayor frecuencia del alelo C para el polimorfismo 1128T>C e incluso que presentan una frecuencia apreciable del genotipo homocigoto mutado (p. ej., en población de la India, con frecuencia de hasta 0,23). En estos estudios no se ha encontrado que ambos polimorfismos estuvieran en un desequilibrio de ligamiento significativo pero sí se ha comunicado alguna asociación positiva para determinados haplotipos.(178,332) Lamentablemente, no hay análisis de haplotipos para estos polimorfismos en poblaciones similares a la nuestra por lo cual, no podemos sacar conclusiones sobre lo hallazgos encontrados al respecto en nuestro estudio.

Variantes genéticas del receptor del GABA-A (GABRA)

Polimorfismos del GABRA1

En este trabajo no se encontraron diferencias alélicas ni genotípicas significativas en los polimorfismos estudiados (rs1037715 y rs2279020) entre los diferentes grupos. El polimorfismo rs2279020 se ha asociado en estudios previos con dependencia alcohólica, según los criterios DSM IV y DSM-III-R en población asiática (coreana y taiwanesa respectivamente)(183,195) a través del genotipo GG el cual evidenció asociación con un inicio del consumo a edades más tempranas y formas graves de alcoholismo (188) y más recientemente se ha descrito la asociación en población de la India, con criterios DSM IV, pero a través de su genotipo AA. (189)

Otros estudios en población caucásica a través de los datos del estudio COGA, no han podido replicar esta asociación.(201)

El meta-análisis publicada por Li y cols. en 2014(199) donde se incluyeron 7 estudios con población caucásica y asiática, evidenció que la frecuencia del alelo A era mayor en población europea (66%), que en población asiática (46%), similar a lo encontrado en nuestro estudio donde el alelo A se presentó en el 59,7% de la muestra. Cuatro estudios mostraron una menor frecuencia del alelo A en casos que en controles, a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio donde el alelo A era más frecuente en dependientes que en controles (62,2% vs 58,4%). Sin embargo no se encontró en dicho meta-análisis significación estadística alélica ni genotípica con la dependencia alcohólica. Un meta-análisis anterior de Dick y cols., del 2005(338) que analizó fundamentalmente población caucásica con base en los datos del estudio COGA, teniendo en cuenta criterios DSM-IV, no encontró asociación de este polimorfismo con la dependencia del alcohol. Sin embargo, cuando ese mismo grupo de trabajo hizo un análisis posterior, pero ajustando los criterios a los sugeridos por el DSM-III-R y los criterios de Feighner, sí encontraron dicha asociación.(195)

En cuanto al polimorfismo rs1037715, el estudio de Dick y cols. 2006(195) que analizó los datos del estudio COGA, encontró asociación entre esta variante y un nivel bajo de respuesta al alcohol. No hay otros estudios que hayan abordado el análisis de este último polimorfismo en este aspecto.

Además de estos resultados controvertidos, tampoco se conoce cómo estos polimorfismos podrían estar involucrados biológicamente en la dependencia del

alcohol, sin embargo, es plausible esta asociación si se tiene en cuenta que los estudios en animales han evidenciado un papel importante en el sistema GABA y el alcohol, concretamente a través de sus receptores. (100,334,335), Se sabe, por ejemplo, que el polimorfismo rs22790290 altera la conformación final de ciertas proteínas del receptor(198) y si se tiene en cuenta que *GABRA1* juntos con otros genes (como *GABRB2*, o *GABRG2*) codifican el mayor subtipo de receptores presentes en el SNC y que el alcohol produce cambios conformacionales y en la respuesta del receptor,(101) podría pensarse que una modificación genotípica podría implicar un cambio en la respuesta del etanol. Varios de los meta-análisis descritos previamente, sin embargo, muestran heterogeneidad y dificultad a la hora de analizar los estudios. Por ejemplo, según los criterios diagnósticos, algunos se han basado en criterios DSM III o IV, y otros en diversos fenotipos o niveles de consumo. (190,333) De hecho, en uno de los meta-análisis, al hacer un cambio en los criterios diagnósticos, se evidenció un cambio en la presencia o no de asociación de un polimorfismo con la dependencia alcohólica.(195) Nuestros datos por tanto, ponen énfasis en el origen poligénico de la enfermedad, en la variabilidad de resultados en función del trasfondo genético de cada población y de la necesidad de una adecuada caracterización fenotípica para progresar en el conocimiento de esta enfermedad. (194)

Análisis de los haplotipos del gen GABRA1

No se encontraron haplotipos que se asociaran de forma significativa con la dependencia alcohólica entre los diferentes grupos analizados en nuestro estudio, ni a través del algoritmo de expectación-maximización de THESIAS ni con el programa HAPLOVIEW. No hay estudios que conozcamos hasta la fecha en pacientes

alcohólicos que hayan analizado estos dos polimorfismos por lo que no podemos contrastar resultados.

En el estudio de Dick y cols.2006 (195) se encontraron tres haplotipos que incluían el polimorfismo rs1037715 (rs4263535-rs4605831-rs1037715; rs4605831-rs1037715-rs980791 y rs1037715-rs980791-rs1157122), asociados estadísticamente significativos para los 4 fenotipos que se analizaron: dependencia de alcohol según los criterios COGA, historia de *blackouts*, edad de la primera borrachera y nivel de respuesta al alcohol. Por lo anterior, parece que este polimorfismo puede tener una influencia importante teniendo en cuenta fundamentalmente los diferentes fenotipos de la dependencia alcohólica, más que como polimorfismo aislado. Nuestro estudio valoró la dependencia alcohólica con los criterios DSM-IV, criterios con los que este último estudio no encontró asociación estadística, pero no disponemos de datos para analizar otros fenotipos del alcoholismo, por lo que no podemos dar más conclusiones al respecto.

Polimorfismos del GABRA2

No se encontró relación con la dependencia alcohólica al analizar las frecuencias alélicas o genotípicas de los polimorfismos rs168697, rs279858, rs9291283 y rs894269 de forma individual. Entre los citados, el polimorfismo más ampliamente estudiado en la literatura es el rs279858 del *GABRA2*. La menor frecuencia alélica se observó en nuestro estudio con el alelo C (C=43,0%, T= 57.0%) , lo cual se correlaciona con lo encontrado en la literatura(194) y que, a su vez, se ha reportado más frecuentemente en pacientes dependientes que en controles sanos:(218) Este alelo se ha asociado también y especialmente en su forma homocigota, con bajo nivel de respuesta al alcohol medido

por la sensación subjetiva de intoxicación tras el consumo, por lo que el individuo podría ser motivado a seguir consumiendo. En otros estudios se ha encontrado un efecto estimulante y eufórico, motivo por el cual, su presencia también podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de un trastorno por consumo de alcohol. (2,3,4,199,205,217, 218,336) Así, en el estudio de Villafuerte y cols. del 2012,(205) los portadores del alelo C en este polimorfismo tenían más posibilidades de tener síntomas de dependencia alcohólica y altas posibilidades de puntuación en las escalas de impulsividad, siendo este efecto mayor en las mujeres. Además cuando se exploró a través de RNM cerebral, se encontró que durante la anticipación a la recompensa las mujeres con genotipo CC mostraron una mayor actividad de la ínsula izquierda en comparación de aquellos que tenían otro genotipo, asociación no encontrada en los hombres. Ello podría indicar que la ínsula desempeña un papel en los impulsos de forma consciente para consumir drogas y para mantener el comportamiento adictivo, con un efecto diferencial de género secundario a las diferencias hormonales. La progesterona puede ejercer su papel en el sistema GABA modulando comportamientos como la ansiedad. (199, 200) Nuestro estudio solo analizó el sexo masculino, por lo que un limitante para el análisis de este polimorfismo en nuestro estudio fue la no inclusión de mujeres.

Por otro lado, el alelo T es más frecuente en individuos sanos que en alcohólicos y se ha asociado con una mayor respuesta sintomática negativa subjetiva frente al alcohol, entre los que destacaban los trastornos digestivos por lo que en algunos estudios parece tener un efecto protector ante un próximo consumo. (199,206,336) Un estudio reciente en población croata, analizó la asociación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica, con la presencia o ausencia de comportamiento agresivo y con

el tipo de dependencia del alcohol según la clasificación de Cloninger, siendo la asociación significativa para estos dos últimos ítems, cuando se ajustó por edad, género y dependencia a la nicotina como co-variables. Según lo observado, los individuos portadores del alelo T podrían tener bajo riesgo de dependencia alcohólica. (OD = 0.68, 95% CI = 0.47 to 0.98, p = 0.0386) al compararlo con los portadores del genotipo CC.(216)

También existen resultados contradictorios: un estudio realizado en humanos *postmortem* encontró que los individuos con genotipo CC y TT podrían ser más sensibles, que los que presentan el genotipo TC, a los efectos gratificantes del alcohol con el subsecuente mayor o menor riesgo de desarrollo de alcoholismo, por lo que el genotipo parece relevante en este tipo de asociación.(218) Y otros estudios han encontrado asociación de forma opuesta: en población caucásica se ha evidenciado un efecto indirecto del genotipo sobre la respuesta subjetiva al alcohol, encontrando mayor estímulo a través del genotipo TT con el consecuente aumento del consumo.(221)

Para integrar estos resultados, el meta-análisis de Li y cols. del 2014,(199) encontró asociación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica a través del alelo C en población europea (OR= 1.21;IC95% 1,1-1,32, P =0,0004) y cuando se analizó en conjunto con los datos del estudio SAGE con población europea-americana (OR= 1,17; IC95% 1,09-1,26, P= 0,0009). Este mismo meta-análisis, que evidenciaba al alelo C como el alelo de riesgo, cuando analizó específicamente la población afro-americana encontró que el alelo C era significativamente más frecuente en controles 58% que en casos 29% y cuando analizó los datos de población de la India la distribución del alelo fue similar entre grupos (36.2% en controles y 35.9% en casos).

Como ya hemos mencionado, el papel de los polimorfismos individuales parece claramente dependiente de otros factores.

No hay mucha literatura sobre el papel de los restantes polimorfismos estudiados en nuestro trabajo ni a nivel molecular o funcional. El más descrito entre estos últimos es el polimorfismo rs9291283 donde se ha visto asociación con la dependencia alcohólica en población europea a través del alelo G,(199,219) aunque algunos estudios no han podido contrastar esta relación(225) o incluso han encontrado asociación pero a través del alelo A.(226)

No están claros los mecanismos biológicos y funcionales que explican la posible implicación de los polimorfismos del GABRA2 con la génesis de la dependencia alcohólica.(2,3) Parece razonable que el polimorfismo rs279858 y probablemente todos los relacionados con GABRA2 se deban estudiar dentro de un contexto clínico donde se caracterice mejor el fenotipo de la población, nivel de consumo, etc., donde se han visto asociaciones positivas, dado que las asociaciones teniendo en cuenta únicamente el ser o no alcohólico no han aportado mayores resultados. (211,337,338) Se ha visto que ciertos genotipos homocigotos pueden desencadenar o no un consumo excesivo de alcohol con el riesgo que esto implica en relación con la respuesta subjetiva tras consumo de alcohol. Algunas hipótesis apuntan a que la posesión del genotipo TT o CC del polimorfismo rs2799858 en presencia de otros factores que modulan la asociación, como la ansiedad, el estrés y la historia familiar, podrían llevar a ese incremento del riesgo de alcoholismo, más que la sola presencia de un alelo o del genotipo como tal.(213,339)

Análisis de los haplotipos del GABRA2

Aunque el estudio individual de los polimorfismos no evidenció resultados significativos, sí se pueden mencionar algunos hallazgos en el análisis de los haplotipos. El haplotipo ATAC (correspondiente a los polimorfismos rs168697, rs279858, rs9291283 y rs894269, por este orden), fue significativamente más frecuente en el grupo de controles (7,2%) que en el de pacientes alcohólicos (4,2%), al compararlo con el haplotipo de referencia ATGC (OR = 0,47 ; IC95%=0,23 – 0,97; P=0,04). Al analizar este mismo resultado con el programa HAPLOVIEW no se pudo replicar dicha asociación, posiblemente por la baja frecuencia de este haplotipo entre ambos grupos.

No hay datos de estudios que hayan evaluado todos los polimorfismos en conjunto como en nuestro trabajo para poder hacer una comparación directa de resultados. Así, la mayor parte de lo escrito en la literatura hace referencia al polimorfismo rs279858 y su relación con otros polimorfismos no estudiados en nuestro estudio (222); los resultados son contradictorios. En primer lugar, el alelo T del polimorfismo rs279858 dentro del haplotipo analizado fue más frecuente dentro de la muestra control relacionándose con protección frente al alcoholismo, como ocurre en otros análisis realizados previamente.(199,206,211,336) Por otro lado, el alelo A del polimorfismo rs9291283 dentro del haplotipo ATAC mencionado (correspondiente a los polimorfismos rs168697, rs279858, rs9291283 y rs894269, por este orden) fue más frecuente en alcohólicos que en controles, aunque este resultado es controvertido debido a que hay estudios que ponen de manifiesto el alelo C como de riesgo en población caucásica(199,219) mientras que otros estudios asignan este papel al alelo A, como por

ejemplo un estudio que valoró población europea-americana no hispánica y población hispánica. (226)

Por otro lado, se ha encontrado asociación de haplotipos que incluyen el alelo G (C) del polimorfismo rs279858 con desórdenes de ansiedad en mujeres que consumen alcohol,(344) y también con dependencia alcohólica, impulsividad y activación de áreas como la ínsula izquierda en relación con la anticipación y la recompensa en mujeres.(200,201) Resulta difícil de interpretar esta controversia en los resultados pero, en todo caso, dada la baja frecuencia del haplotipo ATAC tanto en controles como en alcohólicos (7,2% frente a 4,2%), su relevancia clínica parece escasa.

En la muestra sobre población croata del trabajo de Strac y cols.,(216) se estudiaron tres polimorfismos: rs567926, rs279858 and rs9291283. Al analizar los haplotipos de estos, se observó alto grado de desequilibrio de ligamiento para rs567926 y rs279858, pero no para rs9291283. No hubo diferencias entre los pacientes dependientes y controles en general. En los pacientes portadores de haplotipo AC dentro del grupo dependiente del alcohol, (rs567926 y rs279858 respectivamente), presente en el 1,6% de la muestra, tenían más probabilidades tener un comportamiento agresivo y estaba significativamente más presente en pacientes con una combinación de abuso temprano de alcohol y agresión, según la clasificación Cloninger de alcoholismo de tipo II. En nuestro trabajo no se tuvieron en cuenta fenotipos relacionados con la dependencia alcohólica y los niveles de consumo que es donde la evidencia científica ha arrojado mayor relación con este polimorfismo. (200, 201, 205, 206, 213,218)

Poco se ha descrito de los polimorfismos rs8942689 y del rs168697. En estudios sobre adicción a la cocaína, se ha visto que el rs8942689 se encuentra en alto LD con rs9291283, además, este polimorfismo se encuentra en una región potenciadora cis y se ha hipotetizado que pueda representar la variante causal subyacente que contribuye a la asociación observada con la adicción con otros polimorfismos, entre ellos el rs9291283.(221,340) Sin embargo, en nuestro estudio encontramos desequilibrio de ligamiento completo entre estos dos polimorfismos, indicando que este SNP representa una misma señal en el gen. Un estudio que analizó la dependencia alcohólica y fenotipos de consumo en población caucásica analizó tres polimorfismos: rs567926, rs279858 y rs9291283 encontrándose alto grado de LD entre los dos primeros pero no para el último tanto en casos como en controles.(216)

Como conclusión, existe evidencia de las contribuciones potenciales de las variantes del gen GABRA2 así como del análisis de haplotipos en relación con las diferentes respuestas subjetivas del alcohol, la varianza de la conducta de beber, y el riesgo de la dependencia del mismo.(341) Estas variantes parecen influenciar en los aspectos hedónicos y gratificantes de la respuesta alcohol, siendo esto biológicamente plausible dado que la subunidad $\alpha 2$ se expresa abundantemente en el cuerpo estriado y núcleo *accumbens*, áreas que están involucrados en el procesamiento hedónico y de la recompensa.(222) Parece que el polimorfismo rs279858 por sí solo modera respuestas relacionadas con el refuerzo positivo del alcohol y aunque nuestro estudio solo analizó cuatro polimorfismos en conjunto, no se puede descartar la posibilidad de que otras variantes en desequilibrio de ligamiento con rs279858 o que interaccionen con la misma puedan contribuir a ese refuerzo positivo.(222) Tenemos que considerar que estas

interacciones pueden ser con genes que codifican las diferentes subunidades, dado que estas subunidades de los receptores no son iguales entre sí y no todos los receptores GABA-A presentes en una misma neurona, son igual de sensibles al alcohol. (203,341)

Polimorfismos del gen GABRA 6

No se encontraron diferencias significativas en la distribución alélica y genotípica al analizar de forma individual los polimorfismos rs1992647 y rs2197414 con el alcoholismo. Hasta la fecha no tenemos conocimiento de estudios de estos polimorfismos con dependencia alcohólica o sobre su papel biológico y funcional en patología neuropsiquiátrica.

El análisis del polimorfismo rs3219151 (1519T>C) evidenció una tendencia a una distribución diferente de los genotipos entre alcohólicos y controles. Los pacientes alcohólicos presentaron significativamente más presencia del alelo T (genotipos CT y TT combinados) que los controles (80,8% frente a 72,2%), con un OR de 1,62 para el desarrollo de alcoholismo (IC95%=1,02 a 2,59; $P = 0,042$). Estudios previos realizados en población asiática(200),(188), india(189), europea (escocesa, alemana, finlandesa) (228,229) y población nativa del suroeste americano,(97) han encontrado asociación con la dependencia del alcohol a través de su alelo T, lo que coincide con nuestros resultados. Además, el genotipo TT se ha asociado con un inicio más temprano en el consumo, mayor ingesta de alcohol al día y mayor duración de la dependencia del alcohol. (189)

El meta-análisis del 2014 de Li y cols.,(199)que analizó diez estudios para este polimorfismo, donde se incluyó población europea, asiática y los datos del estudio

SAGE, observó que el alelo T estaba presente en población europea en un 56% de los casos (43–65%) y en un 50% (44–56%) en población control, a diferencia de lo visto en poblaciones asiáticas donde las frecuencias son más bajas (controles sanos 30% [23–34%] y casos 32% [25–44%], respectivamente). De los diez estudios analizados, cinco mostraron mayor frecuencia de este alelo en casos que en controles. Además, cuando se combinaron los datos de todos los estudios, se encontró asociación discreta de ese polimorfismo con la dependencia alcohólica (OR=1,34; IC95% 1,17- 1,54, P= 0,0004). Al hacer el análisis de los diferentes modelos de herencia, se encontró que el modelo dominante presentaba asociación estadísticamente significativa con la dependencia alcohólica, es decir, la comparación entre genotipo AA y AG con GG (OR= 1,5 IC95% 1,23 a 1,84; $P \leq 0,01$). (199) Nuestros datos concuerdan en parte, por tanto, con lo publicado en la literatura; en nuestro estudio se encontró esta misma tendencia para el modelo dominante (OR=1,609; IC95% 0,994 – 2,606; P=0,053), de tal manera que la posesión del alelo A (genotipo AA+AG) tiende a asociarse con el alcoholismo. La limitación en la significación estadística probablemente está en relación con nuestro tamaño muestral, ya que hay fuerte evidencia en la literatura de que la presencia de este alelo se relaciona con dependencia del alcohol. Algunos estudios han descrito el papel funcional del alelo T del rs3219151 del *GABRA6*, encontrando una relación de este alelo con una mayor respuesta fisiológica y endocrina al estrés al modular el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal(347). También se ha mostrado un incremento del riesgo de suicidio cuando está presente por empeoramiento de esos niveles de estrés con el subsecuente incremento de conductas derivadas del mismo como impulsividad, agitación, insomnio, ansiedad, depresión, entre otros. (231) Queda pendiente esclarecer el papel que juega este polimorfismo a nivel molecular y/o funcional con la génesis de

la dependencia alcohólica pero a la luz de lo publicado en otras entidades, es plausible la asociación si se tiene en cuenta la relación bidireccional del estrés y el alcoholismo.(343,344)

Estudio de haplotipos del gen GABRA6

En cuanto al análisis de haplotipos de este gen, los datos de nuestro estudio han evidenciado dos haplotipos con resultados significativos. Al compararlo con el haplotipo de referencia CTT, el haplotipo GCC (correspondiente a los polimorfismos rs1992647- rs2197414 - rs3219151, por este orden) fue significativamente más frecuente en el grupo de controles que en el de alcohólicos (OR=0,73; IC95% 0,54 a 0,99; P=0,04). El haplotipo CTC (correspondiente a los polimorfismos rs1992647- rs2197414 - rs3219151, por este orden) también fue significativamente más frecuente en el grupo de controles que en el de pacientes (OR= 0,56, IC95%= 0,35 – 0,89; P= 0,02) al compararlo con CTT, evidenciando el efecto protector del alelo C en este polimorfismo para la dependencia alcohólica.

Un estudio que evaluó varios polimorfismos encontrados en el gen *cluster* 5q34 del gen GABA-A en población finlandesa y americana nativa del suroeste con criterios DSM III para dependencia alcohólica(97), encontró significación estadística en el análisis de haplotipos cuando se incluyeron tres polimorfismos del GABRA6 para estas dos poblaciones: GABRA6 1031G>C40, GABRA6 1236C>T (Pro385Ser)28 y GABRA6 1519T>C ($P = 0.004$). También se observó significación estadística haplotípica cuando se incluyeron en el análisis a los polimorfismos del GABRA6 1236C>T, GABRA6 1519T>C, GABRG2 IVS9 + 99C>A y GABRG2 IVS10 + 3415A>G ($P = 0.01$ a 0.03). Lo anterior pone en evidencia la importancia que el

polimorfismo rs3219151 del GABRA 6 (1519T>C) tiene a la hora de explicar la dependencia alcohólica. Si bien, no se cuenta con estudios que puedan demostrar que el alelo T en la región 3' no traducida del GABRA6 sea el responsable de los cambios funcionales que se pueden presentar, dado que se encuentra cercano a una región en la que podría estar en desequilibrio de ligamiento con un alelo que podría alterar la expresión o estructura del gen GABRA6 o de otros genes adyacentes, se puede inferir con estos resultados que juega un papel posiblemente importante. Son necesarios otros estudios para evaluar estos resultados.(234)

VARIANTES GENÉTICAS DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Polimorfismo del gen del receptor de la dopamina D1 (*DRD1*)

En nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la distribución de frecuencias alélicas o genotípicas del polimorfismo rs4867798 entre alcohólicos y controles. Se estudió recientemente en otro trabajo en población española tanto en hombres como en mujeres sin encontrar asociación con la dependencia alcohólica, por lo que podemos descartar razonablemente que esta variante genética se relacione con fenotipos relacionados con el consumo excesivo de alcohol. (243)

Polimorfismos del Gen del receptor de la dopamina D2 (*DRD2*) y de la de la cinasa ankirina 1 (*ANKK1*)

No encontramos diferencias significativas en cuanto a la distribución de frecuencias alélicas o genotípicas entre alcohólicos y controles en ninguno de los tres polimorfismos estudiados de forma individual, rs1800497, rs6277 y rs1799978.

En cuanto al polimorfismo rs1800497 o comúnmente llamado Taq1A y ampliamente estudiado, sí se ha asociado previamente con la dependencia alcohólica a través de su alelo menor T, aunque con un tamaño del efecto pequeño.(48:253,254) Nuestros resultados coinciden, en cambio, con otros estudios publicados que no han encontrado dicha asociación.(345,248,256,257) Otro estudio que analizaba los polimorfismos que subyacen a la adicción a las drogas encontró que Taq1A es la tercera variante genética más significativa asociada con fenotipos relacionados con el alcohol.(351)

Le Foll y cols.,(49) recopilaron en 2009 la cifra de 40 estudios de casos y controles relativos a este polimorfismo y su asociación con alcohol. En el análisis global encontraron un exceso modesto pero significativo de la frecuencia del alelo T en pacientes dependientes del alcohol. Sin embargo, la verdadera asociación estadística se encontró en aquellos individuos con un grado de dependencia grave por lo que la heterogeneidad en los resultados de los diferentes estudios podría explicarse desde el punto de vista fenotípico.(49) De la misma forma un estudio en población coreana, encontró asociación de este polimorfismo a través de su alelo T en pacientes alcohólicos dependientes con clasificación de Lesch tipo 1.(352) Como se comentó anteriormente, este polimorfismo ejerce su influencia sobre ANKK1 que se expresa fundamentalmente en los astrocitos; estas células tienen un papel importante en el aprendizaje de las conductas relacionadas con la adicción así como en los efectos reforzantes de las sustancias adictivas. Por tanto, la implicación de este polimorfismo en los fenotipos relacionados con el consumo de alcohol podría estar justificada.(255) En nuestro estudio no disponíamos del análisis por subgrupos en función de la gravedad de la

dependencia, por lo que no se puede valorar si esta posibilidad afectó los resultados del estudio.

Un meta-análisis publicado en 2013,(353) analizó los 61 estudios publicados hasta el 2012 del polimorfismo TaqA1 y dependencia alcohólica, 36 de los cuales se analizaron sobre población europea, 18 en población asiática y los demás en población nativa americana, entre otros grupos. El estudio logró recopilar 9590 casos y 9140 controles para su análisis. Se encontró que el alelo T del TaqA1 fue significativamente más frecuente en población asiática que en europea. Sin embargo, en los dos grupos poblacionales se observó una mayor frecuencia alélica del alelo A1 (T) en pacientes alcohólicos al compararse con sus respectivos controles (Asia 42% (27-51%).El estudio concluye que existe evidencia de un moderado efecto del polimorfismo Taq1A en la dependencia alcohólica en todas las poblaciones y propone la necesidad de realizar a futuro un análisis con un tamaño muestral de 15000 sujetos para tener una adecuada potencia estadística que permita valorar mejor la asociación.

Está claro que la mayoría de estudios en población europea han encontrado esta asociación y posiblemente en nuestro estudio el mayor limitante podría estar relacionado con el tamaño de la muestra. Un estudio español donde se analizaron 103 varones con criterios DSM-III para dependencia y que tuvo en cuenta desórdenes de la personalidad, encontró que el alelo A1 o T estaba presente en el 39% de la muestra frente al alelo A2 o C; los genotipos se distribuyeron así en orden y frecuencia: A2/A2, A1/A1 y A1/A2 (61%/5,8%/33%). La presencia de este alelo A2 (C) se encontró en pacientes con dependencia alcohólica y sobre todo en aquellos que tenían desórdenes de personalidad antisocial, de forma significativa.(354) En un estudio de seguimiento a 10

años se observó un incremento de la mortalidad en los portadores de dicho polimorfismo probablemente relacionado con un incremento en las recaídas al finalizar un programa de tratamiento.(355)

Aunque se ha descrito que el alelo T se encuentra presente en un 32% de la población global y un 18,7% en población europea,(261) diferentes estudios han reportado este alelo T con frecuencias que van desde el 9% hasta 83%,(248,346,350) siendo los porcentajes más elevados en población asiática y australiana.(357) Nuestro estudio encontró una frecuencia global similar a lo reportado en población europea (17,4%), sin embargo, y a diferencia de otros estudios, el alelo más frecuente fue el C en alcohólicos que en controles (83,6% frente a 80,6%) y con una frecuencia del alelo T en este grupo de 16,4% frente a 19,4% en controles, sin llegar a ser esto significativo. No podemos demostrar que el tamaño de la muestra y la frecuencia baja del alelo T con respecto a otros grupos poblacionales en nuestro trabajo puedan influir en este aspecto como se ha podido sugerir en otros estudios. (248,352)

Con estos datos, resulta difícil establecer de forma clara el papel que desempeña este polimorfismo de forma aislada con el riesgo de desarrollar dependencia alcohólica; podrían existir otros factores que interactúen con el polimorfismo, tales como otras características genéticas. Por ejemplo, este polimorfismo afecta a dos genes que se encuentran en el mismo clúster (*DRD2* y *ANKK1*) y se sabe que el polimorfismo rs1800497 se encuentra en alto LD con otros polimorfismos funcionales de *DRD2* que afectan su expresión y *splicing* (246,353) y que esta situación podría alterar la expresión fenotípica en los individuos. Nuestro trabajo, no tuvo en consideración las

características fenotípicas de los individuos, por lo que no podemos sacar conclusiones a este respecto

En cuanto al polimorfismo rs6277 (957C>T) varios estudios han encontrado asociación de este polimorfismo con la dependencia alcohólica.(248,353,354) Existe controversia en la literatura sobre el alelo de riesgo. Un estudio realizado en pacientes alcohólicos australianos encontró que el alelo C, con su genotipo C/C de rs6277 se asoció moderadamente con la dependencia alcohólica en hombres(253) pero otros estudios han encontrado la asociación a través del alelo T.(361) Otro estudio en población caucásica de múltiples familias seleccionadas por la existencia múltiples casos de dependencia alcohólica, encontró una asociación del alelo T y la dependencia alcohólica.(252) En el análisis de casos y controles del estudio se evidenció una tendencia del alelo T a transmitirse más frecuentemente en los pacientes alcohólicos dependientes, cuando se analizó en un modelo dominante de regresión logística, aunque sin llegar a ser significativo ($P = 0.062$). En cambio, cuando se analizó dentro del estudio de asociación de familias, sí se encontró que los resultados fueron significativos ($P = 0.038$). La transmisión del alelo T, o alelo de riesgo, del padre a la progenie afectada fue 1,36 veces más frecuente que la transmisión de un alelo C. De manera similar, el miembro afectado del par de hermanos, mostró un aumento en la frecuencia del alelo T (52%) en comparación con el observado en el miembro no afectado (41%). Diferentes patrones de transmisión alélica de este polimorfismo dentro de familias múltiples parecen conferir variación fenotípica. Nuestro estudio no encontró asociación con la dependencia alcohólica aunque nuestros datos revelan una mayor frecuencia del alelo T en el grupo dependiente que en el control sin ser significativa la diferencia. A la

luz de los datos, puede haber un componente racial que justifique la diferencia entre resultados y en nuestro caso, se añade una posible muestra reducida que permitiera evidenciar la asociación y por tanto una falta de potencia estadística. Respecto a la plausibilidad biológica, no está claro el papel del alelo T en la dependencia alcohólica. Algunos estudios señalan que podría tener un papel protector para el consumo al mostrar un aprendizaje de evitación mejor que los portadores del alelo C.(362) Los resultados sobre el alelo de riesgo han sido importantes en algunos estudios que han evidenciado que los miembros no afectados, y que portan el alelo C, presentan mayor disponibilidad del receptor D2(252) .

El polimorfismo rs1799978 no ha sido previamente estudiado en dependencia alcohólica por lo que nuestros resultados no se pueden comparar con otros estudios para sacar conclusiones. Los polimorfismos estudiados de forma individual podrían tener efectos pequeños, lo que podría explicar el que no llegara alcanzar el poder estadístico suficiente para detectar una asociación.

Análisis de los haplotipos del gen DRD2 y ANKK1

En nuestro estudio un haplotipo constituido por el alelo C del polimorfismo rs1800497 (TaqIA), el alelo T del polimorfismo rs6277 (957C>T) y el alelo G del polimorfismo rs1799978 fue más frecuente en el grupo de dependientes (7%) que en los abusadores del alcohol (2%) al compararlo con el haplotipo de referencia CTA para estos polimorfismos en el orden mencionado (OR=3,62, IC95%= 1,05 – 12,49; $P=0,042$). Sin embargo el estudio de estos tres polimorfismos en conjunto no se ha hecho previamente en la literatura.

En el análisis de haplotipos la mayoría de estudios encuentran relación con la dependencia alcohólica y las variantes que contienen el alelo A1 (T) para TaqIA, así como la variante C del polimorfismo 957C>T.(360)·(359) Ponce y cols., analizaron la interacción de los polimorfismos TaqIA y el 957C>T en pacientes con dependencia alcohólica y que presentaban alteraciones psicopáticas, encontrando que el efecto de genotipo A1+(heterocigoto y homocigoto para el alelo TaqIA A1 (T)) sobre el fenotipo psicopático dependía de la interacción con el genotipo CC de C957T.(359) Al analizar estos polimorfismos en población australiana se observó una mayor frecuencia del alelo T (83%) del polimorfismo Taq1A comparado con nuestro estudio. A pesar de tener un mayor tamaño muestral y de haber encontrado una frecuencia mayor, tuvieron dificultad en encontrar asociación con la dependencia alcohólica al analizar el polimorfismo de forma independiente; sin embargo, al hacer el análisis de haplotipos con el polimorfismo 957C>T, encontraron asociación significativa con la dependencia del alcohol a través del haplotipo más frecuente entre los dependientes, el 957C/Taq1A1 (C/T) ($P=<0,001$), presentando dos veces más probabilidad de asociación con dependencia alcohólica al compararlo con el haplotipo 957T/Taq1A2·(253)

Sin embargo, nuestros resultados haplotípicos significativos incluyen el alelo C del polimorfismo rs1800497 del *ANKK1* y el alelo T del polimorfismo rs6277 del *DRD2* como los alelos de riesgo. Algunos estudios en población alemana, han reportado resultados similares, donde variantes haplotípicas que contienen el alelo C del rs18004971 son más frecuentes en alcohólicos que en controles.(289,360). El estudio de Kraschewski y cols., en población alemana, que tuvo en cuenta antecedentes familiares para el alcohol, criterios CIE-10 para dependencia alcohólica y la clasificación de

Cloninger, evidenció tras estudiar los polimorfismos -141ins/del, 957C>T, 1385A>G y Taq1A por ese orden, que los haplotipos I-C-G-A2 e I-C-A-A1 se presentaron con mayor frecuencia en alcohólicos (P = 0.026, OR: 1.340; P = 0,010, OR: 1,521, respectivamente). Entre los subgrupos analizados por clasificación de Cloninger y antecedentes familiares, encontraron que los haplotipos, ICG-A2 e ICA-A1 tuvieron una mayor frecuencia en alcohólicos Cloninger 1 (P = 0.083 y 0.001, OR: 1.917, respectivamente) y en alcohólicos con antecedentes familiares positivos. También se observó un haplotipo infrecuente, el D-T-A-A2 (P<0.001, OR: 4.614) que se presentó más frecuentemente en individuos con clasificación Cloninger tipo 2 al compararlo con controles.(360)

Las diferencias en los estudios a la hora de analizar los polimorfismos de *DRD2* y *ANKK1* y su relación con la dependencia de alcohol, podrían tener varias explicaciones. Por un lado, podría ser que cuando ambos polimorfismos se analizan juntos en el análisis de genotipado y de haplotipos, la asociación con dependencia alcohólica se hace más fuerte, siendo estos hallazgos relevantes para apoyar la idea de que ambos polimorfismos juegan un rol importante en la dependencia del alcohol y que el *DRD2* y la región adyacente a *ANKK1* se confirman como un clúster de susceptibilidad para esta patología.(253) La cercanía de los genes *ANKK1* y *DRD2* podría hacer que ambos genes interactuaran en las vías de neurotransmisores, afectando la vulnerabilidad de una persona a la adicción y a los rasgos antisociales.(359) Cuando el polimorfismo Taq1A está presente, podría influenciar la actividad del gen *ANKK1*, el cual a su vez, afecta la expresión de *DRD2*,(363) pero también puede ejercer su efecto al interaccionar con polimorfismos como el 957C>T, ya que su proximidad a este

polimorfismo en el *DRD2* puede resultar en un cambio en la regulación de este gen. (248, 358) Lo anterior podría ayudar a explicar también la heterogeneidad en los resultados cuando se analiza de forma individual dicho polimorfismo. Otra explicación estaría dada por la existencia e influencia de sustratos genéticos más complejos, por lo que estudiar a este gen desde sus variantes de forma individual podría aportar información incompleta; muestra de ello es el estudio realizado por Yang y cols., quienes indagaron en esos posibles complejos sustratos genéticos; encontraron una región genómica más amplia en el cromosoma 11q23 que contiene un gen *cluster* de diferentes genes: *NCAM1*, *TTC12*, *ANKK1* y *DRD2* (*cluster* "NTAD") cuyas variantes en diferentes regiones del *gen cluster* se asociaron con el riesgo de dependencia a la nicotina y la dependencia del alcohol en estudio basado en familias así como en un estudio de casos y controles teniendo en cuenta diferentes fenotipos de consumo. (364,365)

Por lo anterior, los hallazgos encontrados en nuestro estudio, podrían reflejar diferentes interacciones genéticas en ambos genes que dificultan la interpretación de la distribución genotípica y alélica. Sin embargo, parece plausible la asociación que ejercen estos dos polimorfismos cuando se presentan de forma conjunta en la dependencia alcohólica y probablemente en rasgos fenotípicos específicos de la misma que no se analizaron en nuestro estudio.

Polimorfismo del gen *DRD3*

Al estudiar de forma individual el polimorfismo rs6280, no se encontraron diferencias significativas tanto alélicas como genotípicas entre los grupos analizados. Se observa una mayor presencia del alelo T (genotipos CT y TT) en los pacientes

alcohólicos (90,8%) frente a los pacientes controles (88,0%), aunque sin llegar a ser significativo, $P= 0,081$. Un estudio realizada en población española de una subcohorte del *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort* (EPIC) que analizó 1533 pacientes de ambos sexos no encontró asociación con excesivo consumo de alcohol definido por ingesta de >70 g/día para hombres y 42 g/día para mujeres.(86) Un meta-análisis realizado en 2015 por Forero y cols., tampoco encontró relación con la dependencia del alcohol incluyendo la valoración por grupos étnicos.(314)

Sin embargo, al analizar este polimorfismo desde el punto de vista fenotípico, se han encontrado varias asociaciones. Un estudio realizado en Corea donde se analizaron los pacientes según la clasificación de Lesch (*Lesch Alcoholic Typology*), la cual tiene en cuenta características como el sustrato familiar, el psicopatológico y el neurobiológico de los individuos consumidores, encontró asociación con aquellos individuos que tenían un fenotipo tipo 1; estos individuos se caracterizan por presentar muy tempranamente síntomas de abstinencia y *craving*.(366) Otro estudio en población coreana encontró relación del polimorfismo con escalas que valoran la ingesta obsesiva y compulsiva del alcohol.(367) En nuestro estudio únicamente tuvimos en cuenta las características que definen a abusadores y dependientes según la clasificación DSM-IV, con lo cual es difícil hacer una comparación más precisa. Lo anterior hace evidente la necesidad de estudiar este tipo de asociaciones teniendo en cuenta los fenotipos de los individuos. Este polimorfismo quizás podría contribuir en la variación a la susceptibilidad al alcoholismo más que a la génesis del mismo.(278)

LIMITACIONES GENERALES DE NUESTRO ESTUDIO

En términos generales la inconsistencia en muchos de los resultados de los diferentes polimorfismos de cada gen analizados en la literatura, incluyendo los de nuestro estudio y su relación con la dependencia alcohólica, puede ser debida a varias razones:

En primer lugar se encuentra las diferentes formas de definir la dependencia alcohólica. Por ejemplo, en algunos estudios se han aplicado criterios DSM III, IV o los criterios CIE-10. Además, en algunos casos se han analizado diversos fenotipos que muchas veces dificulta la comparación.

En segundo lugar, el tamaño de la muestra y poder estadístico varían entre los diferentes estudios individuales y probablemente algunas conclusiones podrán extraerse mejor cuando se cuente con tamaños muestrales más amplios para ver si pequeños cambios observados en estudios se correlacionan realmente con esta patología.

En tercer lugar, un estudio individual de casos y controles podría dar lugar a una asociación incorrecta si las poblaciones de las que se extrajeron las muestras presentan sustanciales diferencias en las frecuencias alélicas.(368) También, se ha evidenciado una relación diferente entre las diversas etnias, por lo que resultados generalizados en los diferentes estudios se deben tomar con cautela.

Otro aspecto a tener en cuenta es que poder determinar claramente cuáles polimorfismos pueden generar una predisposición para la dependencia no es del todo fácil dado que algunos de ellos están implicados en otras patologías psiquiátricas,

pueden poseer una relación compleja con otras variantes génicas que también podrían explicar la enfermedad, sin contar con los factores ambientales que pueden estar influenciando la expresión de los genes; todo ello hace que sacar conclusiones a partir de un único polimorfismo pueda ser complicado y arriesgado en algunos casos.

Muchos de los estudios realizados hasta ahora en general no han mostrado resultados claros de la asociación de un determinado polimorfismo con la dependencia alcohólica y el problema puede estar dado por la generalización de las características de la muestra analizada y no según características que tengan en cuenta el contexto psicosocial, familiar y biológico.(369)

Parece relevante conocer a fondo los posibles mecanismos genéticos implicados en la dependencia alcohólica y encontrar los sitios donde cada individuo presenta mayor susceptibilidad para el consumo patológico, para aportar así un tratamiento más individualizado y efectivo y con menos efectos secundarios, (369) pues, de momento, el tratamiento farmacológico del que actualmente se dispone funciona para algunos pacientes pero para otros no. (370)

CONCLUSIONES

En nuestro trabajo se estudiaron 18 polimorfismos localizados en 8 genes pertenecientes a los sistemas GABA, dopaminérgico, NPY y BDNF, los cuales están involucrados en la fisiopatología de la dependencia alcohólica. Las conclusiones fundamentales del estudio son las siguientes:

1. El genotipo GG del polimorfismo rs6265 (Val66Met) del gen BDNF es más frecuente en pacientes alcohólicos que en controles, por lo que su presencia podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de alcoholismo.

2. No hay evidencia de la participación en la dependencia o abuso de alcohol de los dos polimorfismos analizados del gen NPY.

3. Los dos polimorfismos estudiados del gen GABRA1, analizados tanto de forma individual como mediante análisis de haplotipos, no muestran asociación con la predisposición genética a la dependencia o abuso de alcohol.

4. Los polimorfismos analizados en el gen GABRA2 no muestran asociación de forma individual con la dependencia o abuso de alcohol. Sin embargo, existe una presencia significativamente mayor de un determinado haplotipo de este gen en los individuos controles sanos, por lo que podría ejercer un posible papel protector para el desarrollo de alcoholismo.

5. Los polimorfismos estudiados del gen GABRA6 no evidencian asociación con dependencia alcohólica de forma individual. Sin embargo, sí se encontró una presencia significativamente mayor de dos haplotipos de este gen en los controles sanos.

6. No hay evidencia de la participación en la dependencia o abuso de alcohol de

los polimorfismos analizados del gen del DRD1.

7. No hay evidencia de la implicación individual en el alcoholismo de las tres variantes genéticas localizadas en los genes DRD2 y ANKK1. Sin embargo, sí se encuentra una presencia significativamente mayor en un determinado haplotipo de estos genes en los individuos dependientes, por lo que podría ser un factor de riesgo para dependencia alcohólica.

8. No hay evidencia de la participación en la dependencia o abuso de alcohol del polimorfismo analizado del gen del DRD3.

BIBLIOGRAFÍA

1. García Belmar A, Bertomeu Sánchez JR. Nombrar la materia : una introducción histórica a la terminología química. 1a. ed. Ediciones del Serbal, editor. Barcelona; 1999.
2. Blanco A, Guijarro F, Pozas R, Uruga C. Origen y Evolución del término "Alcohol." Grupo QUIMESCA. 2003.
3. Stone Pages Archaeo News: 8,000-year-old wine unearthed in Georgia [Internet]. The independent. [consultado 6/03/2017]. Disponible en: <http://www.stonepages.com/news/archives/000498.html>
4. Berkowitz M. World's Earliest Wine [Internet]. The Archaeological Institute of America. 1996 [consultado 13/10/2019]. Disponible en: <https://archive.archaeology.org/9609/newsbriefs/wine.html>
5. Warner JW. Craze: Gin and Debauchery in an Age of Reason. Londres: 2002;
6. Navarro V. Desarrollo industria alcoholera. [Internet]. Monografias.com. [cited 2019 Oct 13]. Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos82/desarrollo-industria-alcoholera/desarrollo-industria-alcoholera.shtml>
7. La Ley Seca, la era de la prohibición en Estados Unidos [Internet]. Historia - National Geographic. [consultado 19/09/2020]. Disponible en: https://historia.nationalgeographic.com.es/a/ley-seca-era-prohibicion-estados-unidos_12311
8. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization. Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneve 2018. [Consultado el 4/09/2019]
9. Regional Office for Europe releases report on alcohol in the European Union. World Health Organization .Geneve 2015. [Consultado el 4/09/2019]
10. World Health Organization (WHO). Status report on alcohol consumption, harm and policy responses in 30 European countries 2019. Geneve 2019. [Consultado el 4/09/2019]
11. Pla Nacional sobre Drogues - Encuestas y estudios. Encuesta sobre alcohol y drogas en España, EDADES 2017-2018. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - [Internet]. 2017 [consultado 10/10/2019]. Disponible en:

http://www.pnsd.mscbs.gob.es/ca/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/encuestas_EDADES.htm

12. Informe anual del SistemaAutonómico de Información sobre Toxicomanías de Castilla y León. Junta de Castilla y León. [Internet]. 2017 [consultado 11/10/2019]. Disponible en: http://www.jcyl.es/web/jcyl/Familia/es/Plantilla100/1193641915217/_/_/_:
13. Problems related to alcohol consumption.Meeting (1979 : Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (1980). Vol. NO. 650, World Health Organization - Technical Report Series. 1980.
14. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,Fifth Edition (DSM-5). Fifth. May 18, 2013.
15. Panamericana La Salud O DE. CIE-10 Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud Décima Revisión Volumen 2 Manual de instrucciones. 1995.
16. DSM-IV TR: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Barcelona: Masson; 2001.
17. Global status report on alcohol and health 2014. World Health Organization.Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneve . 2015.
18. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). National Alcohol Screening Day. 2004.
19. Jiménez M, Monasor R, Rubio G. Instrumentos de evaluación en el alcoholismo. Trastor Adict. 2003 Apr 13;05(01):13–21.
20. Ochoa Mangado E, Madoz-Gúrpide A, Vicente Muelas N. Diagnóstico y tratamiento de la dependencia de alcohol. Med Segur Trab (Madr). 2009 Apr 13;55(214):26–40.
21. McGough NNH, He D-Y, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, et al. RACK1 and Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Homeostatic Pathway That Regulates Alcohol Addiction. J Neurosci. 2004 Feb 10;24(46):10542–52.
22. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. Neuropsychopharmacology. 2010 Apr 21;35(1):217–38.
23. Pava MJ, Woodward JJ. A Review of the Interactions between Alcohol and the Endocannabinoid System: Implications for Alcohol Dependence and Future Directions for Research. Alcohol. 2012 Feb 21;46(3):185–204.

24. Friedman LS. Complications associated with blood alcohol concentration following injury. *Alcohol*. 2014 Apr 21;48(4):391–400.
25. Gual A. Monografía Alcohol. *Adicciones Rev sociodrogalcohol*. 2002 Aug 31;14.
26. Paul CA, Au R, Fredman L, Massaro JM, Seshadri S, DeCarli C, et al. Association of Alcohol Consumption with Brain Volume in the Framingham Study. *Arch Neurol*. 2008 Oct 24;65(10):1363–7.
27. Vetreno RP, Hall JM, Savage LM. Alcohol-related amnesia and dementia: Animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiol Learn Mem*. 2011 Oct 24;96(4):596–608.
28. Ridley NJ, Draper B, Withall A. Alcohol-related dementia: an update of the evidence. *Alzheimers Res Ther*. 2013 Oct 24;5(1):3.
29. Harris GJ, Oscar-Berman M, Gansler A, Streeter C, Lewis RF, Ahmed I, et al. Hypoperfusion of the Cerebellum and Aging Effects on Cerebral Cortex Blood Flow in Abstinent Alcoholics: A SPECT Study. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Oct 24;23(7):1219–27.
30. de la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol*. 2014 Oct 24;127(1):71–90.
31. Chamorro Fernández AJ, Marcos Martín M, Laso Guzmán FJ. Encefalopatía de Wernicke en el paciente alcohólico. *Rev Clínica Española*. 2011 Apr 23;211(9):458–63.
32. Sehgal V, Kesav P, Modi M, Ahuja CK. Acute Marchiafava-Bignami disease presenting as reversible dementia in a chronic alcoholic. *BMJ Case Rep*. 2013 Oct 24;2013.
33. Monte R, Rabuñal R, Casariego E, Bal M, Pértega S. Risk factors for delirium tremens in patients with alcohol withdrawal syndrome in a hospital setting. *Eur J Intern Med*. 2009 Nov;20(7):690–4.
34. Monte-Secades R, Rabuñal-Rey R, Guerrero-Sande H. Síndrome de abstinencia alcohólica en pacientes hospitalizados. *Rev Clínica Española*. 2015 Mar;215(2):107–16.
35. Hayes V, Demirkol A, Ridley N, Withall A, Draper B. Alcohol-related cognitive impairment: current trends and future perspectives. Vol. 6, *Neurodegenerative disease management*. 2016. p. 509–23.
36. Álvarez FJ, Valderrama JC. Tratamientos de los pacientes con patología dual.

- Trastornos Adictivos. 2007 Apr 1;9(2):73–4.
37. Chakravorty S, Chaudhary NS, Brower KJ. Alcohol Dependence and Its Relationship With Insomnia and Other Sleep Disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016 Nov;40(11):2271–82.
 38. Spanagel R. Alcoholism: A Systems Approach From Molecular Physiology to Addictive Behavior. *Physiol Rev*. 2009 Feb 25;89(2):649–705.
 39. Volkow ND, Koob G, Baler R. Biomarkers in Substance Use Disorders. *ACS Chem Neurosci*. 2015 Oct 24;6(4):522–5.
 40. Koob GF. Neurocircuitry of alcohol addiction: Synthesis from animal models. *Handb Clin Neurol*. 2014;
 41. MOST D, FERGUSON L, HARRIS RA. Molecular basis of alcoholism. *Handb Clin Neurol*. 2014 Mar 5;125:89–111.
 42. McClintick JN, McBride WJ, Bell RL, Ding Z-M, Liu Y, Xuei X, et al. Gene Expression Changes in Glutamate and GABA-A Receptors, Neuropeptides, Ion Channels, and Cholesterol Synthesis in the Periaqueductal Gray Following Binge-Like Alcohol Drinking by Adolescent Alcohol-Preferring (P) Rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016 May;40(5):955–68.
 43. McClintick JN, McBride WJ, Bell RL, Ding Z-M, Liu Y, Xuei X, et al. Gene expression changes in serotonin, GABA-A receptors, neuropeptides and ion channels in the dorsal raphe nucleus of adolescent alcohol-preferring (P) rats following binge-like alcohol drinking. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015 Feb;129:87–96.
 44. Koob GF, Buck CL, Cohen A, Edwards S, Park PE, Schlosburg JE, et al. Addiction as a Stress Surfeit Disorder. *Neuropharmacology*. 2014 Apr 21;76(0 0).
 45. Deng X, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr Drug Abuse Rev*. 2008;1(1):3–8.
 46. Spina L, Longoni R, Vinci S, Ibba F, Peana AT, Muggironi G, et al. Role of dopamine D1 receptors and extracellular signal regulated kinase in the motivational properties of acetaldehyde as assessed by place preference conditioning. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010 Apr;34(4):607–16.
 47. Tabakoff B, Hoffman PL. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Nov 15;113:20–37.
 48. Ron D, Barak S. Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours.

- Nat Rev Neurosci. 2016;17(9):576–91.
49. Foll B Le, Gallo A, Strat Y Le, Lu L, Gorwood P. Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review: Behav Pharmacol. 2009 May 2;20(1):1–17.
 50. MA H, ZHU G. The dopamine system and alcohol dependence. Shanghai Arch Psychiatry. 2014 Nov 17;26(2):62.
 51. Yau WY, Zubieta JK, Weiland BJ, Samudra PG, Zucker RA, Heitzeg MM. Nucleus *accumbens* response to incentive stimuli anticipation in children of alcoholics: relationships with precursive behavioral risk and lifetime alcohol use. J Neurosci. 2012;32(7):2544–51.
 52. Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. J Neurosci. 1998;18(19):8003–15.
 53. Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Tomasi D. Addiction Circuitry in the Human Brain. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012 Apr 20;52:321–36.
 54. Ceballos N, Sharma S. Risk and Resilience: The Role of Brain-derived Neurotrophic Factor in Alcohol Use Disorder. AIMS Neurosci. 2016;3(4):398–432.
 55. Jayaram-Lindström N, Ericson M, Steensland P, Jerlhag E. Dopamine and Alcohol Dependence: From Bench to Clinic. In: Recent Advances in Drug Addiction Research and Clinical Applications. InTech; 2016.
 56. Gilpin NW, Herman MA, Roberto M. The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. Biol Psychiatry. 2015 May 15;77(10):859–69.
 57. Bühler M, Mann K. Alcohol and the Human Brain: A Systematic Review of Different Neuroimaging Methods. Alcohol Clin Exp Res. 2011 Oct 24;35(10):1771–93.
 58. Koob GF. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. Addiction. 2006 Oct 24;101:23–30.
 59. Kalivas PW, Volkow ND. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. Am J Psychiatry. 2005 Oct 25;162(8):1403–13.
 60. Volkow, Nora; Wang, Gene-Jack; Fowler, Joanna; Tomasi D. Neuroimaging of Addiction. In: Philip Seeman and Bertha Madras, editor. Imaging of the Human Brain in Health and Disease. Elsevier; 2014. p. 1–26.

61. Fernández AE, Hernando LFC. Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones Rev sociodrogalcohol*. 2014 Feb 1;26(4):360–70.
62. Pandey SC. A Critical Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alcohol Consumption. *Biol Psychiatry*. 2016 Mar 15;79(6):427–9.
63. Davis MI. Ethanol-BDNF interactions: Still More Questions than Answers. *Pharmacol Ther*. 2008 Apr 20;118(1):36–57.
64. Lipsky RH, Marini AM. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Survival and Behavior-Related Plasticity. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr 19;1122(1):130–43.
65. Sinson G, Perri BR, Trojanowski JQ, Flamm ES, McIntosh TK. Improvement of cognitive deficits and decreased cholinergic neuronal cell loss and apoptotic cell death following neurotrophin infusion after experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 1997 Apr 20;86(3):511–8.
66. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino a, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003;112:257–69.
67. Kyzar EJ, Pandey SC. Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neurosci Lett*. 2015 Aug 5;601:11–9.
68. Huang M-C, Chen C-H, Chen C-H, Liu S-C, Ho C-J, Shen WW, et al. Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol*. 2008 Apr 19;43(3):241–5.
69. Joe K-H, Kim Y-K, Kim T-S, Roh S-W, Choi S-W, Kim Y-B, et al. Decreased Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Patients With Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Apr 19;31(11):1833–8.
70. Jockers-Scherübl MC, Bauer A, Kuhn S, Reischies F, Danker-Hopfe H, Schmidt LG, et al. Nerve growth factor in serum is a marker of the stage of alcohol disease. *Neurosci Lett*. 2007 Apr 20;419(1):78–82.
71. Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology*. 2007;55(1):2–13.
72. Cui C, Noronha A, Warren KR, Koob GF, Sinha R, Thakkar M, et al. Brain pathways to recovery from alcohol dependence. *Alcohol*. 2015 Aug;49(5):435–52.
73. Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz J-C, Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization.

- Nature. 2001 Apr 20;411(6833):86–9.
74. Yan QS, Feng MJ, Yan SE. Different expression of brain-derived neurotrophic factor in the nucleus *accumbens* of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats. *Brain Res.* 2005;1035(2):215–8.
 75. Bahi A, Dreyer JL. Striatal modulation of BDNF expression using microRNA124a-expressing lentiviral vectors impairs ethanol-induced conditioned-place preference and voluntary alcohol consumption. *Eur J Neurosci.* 2013;38(2):2328–37.
 76. Bhave S V, Ghoda L, Hoffman PL. Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci.* 1999;19(9):3277–86.
 77. Warnault V, Darcq E, Morisot N, Phamluong K, Wilbrecht L, Massa SM, et al. The BDNF Valine 68 to Methionine Polymorphism Increases Compulsive Alcohol Drinking in Mice That Is Reversed by Tropomyosin Receptor Kinase B Activation. *Biol Psychiatry.* 2016 Mar 15;79(6):463–73.
 78. Logrip ML, Barak S, Warnault V, Ron D. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. *Brain Res.* 2015 Dec 2;1628(Pt A):60–7.
 79. John MacLennan A, Leea N, Walker DW. Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1995 Apr 20;197(2):105–8.
 80. Han C, Bae H, Won S-D, Roh S, Kim D-J. The relationship between brain-derived neurotrophic factor and cognitive functions in alcohol-dependent patients: a preliminary study. *Ann Gen Psychiatry.* 2015;14(1):30.
 81. Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K. Effector Immediate-Early Gene *Arc* in the Amygdala Plays a Critical Role in Alcoholism. *J Neurosci.* 2008 Apr 20;28(10):2589–600.
 82. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Digneon P, Arancibia S, Beaugé F. Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *J Neurosci Res.* 2001 Apr 20;63(2):200–8.
 83. Costa M-A, Girard M, Dalmay F, Malauzat D. Brain-Derived Neurotrophic Factor Serum Levels in Alcohol-Dependent Subjects 6 Months After Alcohol Withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011 Apr 19;35(11):1966–73.
 84. Cippitelli A, Rezvani AH, Robinson JE, Eisenberg L, Levin ED, Bonaventure P, et al.

- The novel, selective, brain-penetrant neuropeptide Y Y2 receptor antagonist, JNJ-31020028, tested in animal models of alcohol consumption, relapse, and anxiety. *Alcohol*. 2011 Apr 19;45(6):567–76.
85. Thorsell A, Mathé AA. Neuropeptide Y in Alcohol Addiction and Affective Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8.
 86. Gilpin NW, Roberto M. Neuropeptide modulation of central amygdala neuroplasticity is a key mediator of alcohol dependence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Nov 17;36(2):873–88.
 87. Thorsell A. Neuropeptide Y (NPY) in alcohol intake and dependence. *Peptides*. 2007 Apr 19;28(2):480–3.
 88. Thiele TE, Badia-Elder NE. A role for neuropeptide Y in alcohol intake control: evidence from human and animal research. *Physiol Behav*. 2003 Nov 5;79(1):95–101.
 89. Kauhanen J, Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Tuomainen T-P, Uusitupa MIJ, et al. Neuropeptide Y polymorphism and alcohol consumption in middle-aged men. *Am J Med Genet*. 2000 Sep 3;93(2):117–21.
 90. Gilpin NW. Neuropeptide Y (NPY) in the extended amygdala is recruited during the transition to alcohol dependence. *Neuropeptides*. 2012 Nov 17;46(6):253–9.
 91. Rossetti I, Zambusi L, Maccioni P, Sau R, Provini L, Castelli MP, et al. Predisposition to Alcohol Drinking and Alcohol Consumption Alter Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide, Neuropeptide Y, and Microglia in Bed Nucleus of Stria Terminalis in a Subnucleus-Specific Manner. *Front Cell Neurosci*. 2019;13.
 92. Xu K, Hong KA, Zhou Z, Hauger RL, Goldman D, Sinha R. Genetic Modulation of Plasma NPY Stress Response is Suppressed in Substance Abuse: Association with Clinical Outcomes. *Psychoneuroendocrinology*. 2012 Jun 17;37(4):554–64.
 93. Wetherill L, Schuckit MA, Hesselbrock V, Xuei X, Liang T, Dick DM, et al. Neuropeptide Y Receptor Genes Are Associated with Alcohol Dependence, Alcohol Withdrawal Phenotypes and Cocaine Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Jun 17;32(12):2031–40.
 94. Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. Stoichiometry of a recombinant GABA(A) receptor. *J Neurosci*. 1996 Sep 1;16(17):5415–24.
 95. Ducci F, Goldman D. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction*. 2008 Sep;103(9):1414–28.

96. Grobin AC, Matthews DB, Devaud LL, Morrow AL. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;139(1-2):2-19.
97. Radel M, RL V, Iwata N, al et. HApIotype-based localization of an alcohol dependence gene to the 5q34 γ -aminobutyric acid type a gene cluster. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 May 3;62(1):47-55.
98. Lobo IA, Harris RA. GABAA receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 May 3;90(1):90-4.
99. Boyle AE, Segal R, Smith BR, Amit Z. Bidirectional effects of GABAergic agonists and antagonists on maintenance of voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Sep;46(1):179-82.
100. Parsian A, Cloninger CR. Human GABAA receptor alpha 1 and alpha 3 subunits genes and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 May;21(3):430-3.
101. Olsen RW, Liang J. Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. *Mol Brain*. 2017 Dec 20;10(1):45.
102. Carr LG, Spence JP, Peter Eriksson CJ, Lumeng L, Li T-K. AA and ANA rats exhibit the R100Q mutation in the GABAA receptor α 6 subunit. *Alcohol*. 2003 Nov 21;31(1-2):93-7.
103. Saba L, Porcella A, Sanna A, Congeddu E, Marziliano N, Mongeau R, et al. Five mutations in the GABAA α 6 gene 5' flanking region are associated with a reduced basal and ethanol-induced α 6 upregulation in mutated Sardinian alcohol non-preferring rats. *Mol Brain Res*. 2005 Jun 27;137(1-2):252-7.
104. Kumar S, Fleming RL, Morrow AL. Ethanol regulation of γ -aminobutyric acidA receptors: genomic and nongenomic mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2004 May 3;101(3):211-26.
105. Prisciandaro JJ, Schacht JP, Prescott AP, Renshaw PF, Brown TR, Anton RF. Brain Glutamate, GABA, and Glutamine Levels and Associations with Recent Drinking in Treatment-Naïve Individuals with Alcohol Use Disorder Versus Light Drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019 Feb 10;43(2):221-6.
106. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jun 1;4(6).
107. Morisot, Ron. Alcohol-dependent molecular adaptations of the NMDA receptor system. *Genes Brain Behav*. 2017;16(1):139-48.

108. Xu M, Smothers CT, Woodward JJ. Effects of ethanol on phosphorylation site mutants of recombinant N-methyl-d-aspartate receptors. *Alcohol*. 2011;45(4):373–80.
109. Weiss F, Porrino LJ. Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction: Recent Advances and Challenges. *J Neurosci*. 2002 Nov 21;22(9):3332–7.
110. Boileau I, Assaad J-M, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, et al. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus *accumbens*. *Synapse*. 2003 Sep 15;49(4):226–31.
111. Urban NBL, Kegeles LS, Slifstein M, Xu X, Martinez D, Sakr E, et al. Sex Differences in Striatal Dopamine Release in Young Adults After Oral Alcohol Challenge: A Positron Emission Tomography Imaging Study With [¹¹C]Raclopride. *Biol Psychiatry*. 2010 Oct 15;68(8):689–96.
112. Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Apr 19;35(2):129–50.
113. Koistinen M, Tuomainen P, Hyytiä P, Kiianmaa K. Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(11):1605–12.
114. Engleman EA, McBride WJ, Wilber AA, Shaikh SR, Eha RD, Lumeng L, et al. Reverse Microdialysis of a Dopamine Uptake Inhibitor in the Nucleus *Accumbens* of Alcohol-Preferring Rats: Effects on Dialysate Dopamine Levels and Ethanol Intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000 Nov 21;24(6):795–801.
115. Le Moal M, Koob GF. Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007 Nov 21;17(6–7):377–93.
116. Becker HC, Mulholland PJ. Neurochemical mechanisms of alcohol withdrawal. *Handb Clin Neurol*. 2014;125:133–56.
117. Diana M. The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front psychiatry*. 2011;2:64.
118. Koob GF. Theoretical Frameworks and Mechanistic Aspects of Alcohol Addiction: Alcohol Addiction as a Reward Deficit Disorder. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013 Apr 21;13:3–30.
119. Stefanini E, Frau M, Garau MG, Garau B, Fadda F, Gessa GL. Alcohol-preferring rats have fewer dopamine D2 receptors in the limbic system. *Alcohol Alcohol*. 1992 Mar;27(2):127–30.

120. Thanos PK, Taintor NB, Rivera SN, Umegaki H, Ikari H, Roth G, et al. DRD2 gene transfer into the nucleus *accumbens* core of the alcohol preferring and nonpreferring rats attenuates alcohol drinking. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004 May;28(5):720–8.
121. Thanos PK, Volkow ND, Freimuth P, Umegaki H, Ikari H, Roth G, et al. Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J Neurochem*. 2001 Sep 20;78(5):1094–103.
122. Narendran R, Mason NS, Paris J, Himes ML, Douaihy AB, Frankle WG. Decreased prefrontal cortical dopamine transmission in alcoholism. *Am J Psychiatry*. 2014 Aug;171(8):881–8.
123. Cunningham CL, Howard MA, Gill SJ, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67(4):693–9.
124. Risinger FO, Freeman PA, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK. Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000;152(3):343–50.
125. Terenius L, Johansson B. The opioid systems – Panacea and nemesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 21;396(1):140–2.
126. Fields HL, Margolis EB. Understanding opioid reward. *Trends Neurosci*. 2015;38(4):217–25.
127. Koob GF. Chapter 3 – Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 2014. p. 33–54.
128. Oslin DW, Berrettini W, Kranzler HR, Pettinati H, Gelernter J, Volpicelli JR, et al. A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2003;28(8):1546–52.
129. Basavarajappa BS. Endocannabinoid System and Alcohol Abuse Disorders. In *Springer, Cham*; 2019. p. 89–127.
130. Serrano A, Pavon FJ, Buczynski MW, Schlosburg J, Natividad LA, Polis IY, et al. Deficient endocannabinoid signaling in the central amygdala contributes to alcohol dependence-related anxiety-like behavior and excessive alcohol intake. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(9):1840–50.
131. Colombo G, Serra S, Vacca G, Carai MAM, Gessa GL. Endocannabinoid system and alcohol addiction: Pharmacological studies. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Nov 21;81(2):369–80.

132. Economidou D, Mattioli L, Cifani C, Perfumi M, Massi M, Cuomo V, et al. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Nov 21;183(4):394–403.
133. Hungund BL, Basavarajappa BS, Vadasz C, Kunos G, Rodriguez de Fonseca F, Colombo G, et al. Ethanol, Endocannabinoids, and the Cannabinoidergic Signaling System. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Nov 21;26(4):565–74.
134. Collier JK, Hutchinson MR. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: Mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol Ther*. 2012 Apr 20;134(2):219–45.
135. Sari Y, Johnson VR, Weedman JM. Role of the serotonergic system in alcohol dependence: From animal models to clinics. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2011. p. 401–43.
136. Yan D, Schulte MK, Bloom KE, White MM. Structural features of the ligand-binding domain of the serotonin 5HT₃ receptor. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5537–41.
137. Heinz A, Ragan P, Jones DW, Hommer D, Williams W, Knable MB, et al. Reduced central serotonin transporters in alcoholism. *Am J Psychiatry*. 1998;155(11):1544–9.
138. Kenna GA, Zywiak WH, Swift RM, McGeary JE, Clifford JS, Shoaff JR, et al. Ondansetron and sertraline may interact with 5-HTTLPR and DRD4 polymorphisms to reduce drinking in non-treatment seeking alcohol-dependent women: Exploratory findings. *Alcohol*. 2014 Sep 1;48(6):515–22.
139. Sachs BD, Salahi AA, Caron MG. Congenital brain serotonin deficiency leads to reduced ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice. *Neuropharmacology*. 2014;77:177–84.
140. Johnson BA, Ait-Daoud N, Seneviratne C, Roache JD, Javors MA, Wang X-Q, et al. Pharmacogenetic approach at the serotonin transporter gene as a method of reducing the severity of alcohol drinking. *Am J Psychiatry*. 2011 Mar;168(3):265–75.
141. Kenna GA, Zywiak WH, Swift RM, McGeary JE, Clifford JS, Shoaff JR, et al. Ondansetron reduces naturalistic drinking in nontreatment-seeking alcohol-dependent individuals with the ll 5'-HTTLPR genotype: A laboratory study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(6):1567–74.
142. Kranzler HR, McKay JR. Personalized Treatment of Alcohol Dependence. *Curr*

- Psychiatry Rep. 2012 Jun 27;14(5):486–93.
143. Koob GF, Le Moal M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2008 Apr 21;363(1507):3113–23.
 144. Koob GF, Zorrilla EP. Neurobiological mechanisms of addiction: Focus on corticotropin-releasing factor. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010 Apr 21;11(1):63.
 145. Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol.* 2014 Apr 21;35(2):234–44.
 146. Merikangas KR, Avenevoli S. Implications of genetic epidemiology for the prevention of substance use disorders. *Addict Behav.* 2000 Sep 4;25(6):807–20.
 147. Kimura M, Higuchi S. Genetics of alcohol dependence. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2011;65(3):213–25.
 148. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005 Sep 2;19(4):333–41.
 149. Bierut LJ, Agrawal A, Bucholz KK, Doheny KF, Laurie C, Pugh E, et al. A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 17;107(11):5082–7.
 150. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med.* 2010 Sep 2;363(2):166–76.
 151. Reich T, Edenberg HJ, Goate A, Williams JT, Rice JP, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am J Med Genet.* 1998 Apr 20;81(3):207–15.
 152. Kapoor M, Wang J-C, Wetherill L, Le N, Bertelsen S, Hinrichs AL, et al. Genome-wide survival analysis of age at onset of alcohol dependence in extended high-risk COGA families. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Jun 22;142:56–62.
 153. Heath AC, Martin NG. Genetic influences on alcohol consumption patterns and problem drinking: results from the Australian NH&MRC twin panel follow-up survey. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Feb 28;708:72–85.
 154. Johnson C, Drgon T, Liu Q-R, Walther D, Edenberg H, Rice J, et al. Pooled association genome scanning for alcohol dependence using 104,268 SNPs: validation and use to identify alcoholism vulnerability loci in unrelated individuals from the collaborative study on the genetics of alcoholism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Dec 5;141B(8):844–53.
 155. Kranzler HR, Zhou H, Kember RL, Vickers Smith R, Justice AC, Damrauer S, et al.

- Genome-wide association study of alcohol consumption and use disorder in 274,424 individuals from multiple populations. *Nat Commun.* 2019 Dec 2;10(1):1499.
156. Sun Y, Chang S, Wang F, Sun H, Ni Z, Yue W, et al. Genome-wide association study of alcohol dependence in male Han Chinese and cross-ethnic polygenic risk score comparison. *Transl Psychiatry.* 2019 Dec 7;9(1):249.
 157. Clarke T-K, Adams MJ, Davies G, Howard DM, Hall LS, Padmanabhan S, et al. Genome-wide association study of alcohol consumption and genetic overlap with other health-related traits in UK Biobank (N=112 117). *Mol Psychiatry.* 2017;22(10):1376–84.
 158. Edenberg HJ, Foroud T. REVIEW: The genetics of alcoholism: identifying specific genes through family studies. *Addict Biol.* 2006 Apr 20;11(3–4):386–96.
 159. Enoch M-A. Genetic Influences on the Development of Alcoholism. *Curr Psychiatry Rep.* 2013 Nov 17;15(11).
 160. Köhnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: A review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol.* 2008 Apr 20;75(1):160–77.
 161. Porjesz B, Begleiter H, Wang K, Almasy L, Chorlian DB, Stimus AT, et al. Linkage and linkage disequilibrium mapping of ERP and EEG phenotypes. *Biol Psychol.* 2002 Apr 20;61(1–2):229–48.
 162. Rodd ZA, Bertsch BA, Strother WN, Le-Niculescu H, Balaraman Y, Hayden E, et al. Candidate genes, pathways and mechanisms for alcoholism: an expanded convergent functional genomics approach. *Pharmacogenomics J.* 2006 Apr 20;7(4):222–56.
 163. Ehlers CL, Gizer IR. Evidence for a Genetic Component for Substance Dependence in Native Americans. *Am J Psychiatry.* 2013 Nov 17;170(2):154.
 164. Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, et al. Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an american indian population. *Am J Med Genet.* 1998 Apr 20;81(3):216–21.
 165. Ilchibaeva T V, Tsybko AS, Kozhemyakina R V, Kondaurova EM, Popova NK, Naumenko VS. Genetically defined fear-induced aggression: Focus on BDNF and its receptors. *Behav Brain Res.* 2018 May 2;343:102–10.
 166. Haerian BS. BDNF rs6265 polymorphism and drug addiction: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2013 Apr 20;14(16):2055–65.

167. Harrisberger F, Smieskova R, Schmidt A, Lenz C, Walter A, Wittfeld K, et al. BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;55:107–18.
168. Shen T, You Y, Joseph C, Mirzaei M, Klistorner A, Graham SL, et al. BDNF Polymorphism: A Review of Its Diagnostic and Clinical Relevance in Neurodegenerative Disorders. *Aging Dis*. 2018 Jun;9(3):523–36.
169. Toh YL, Ng T, Tan M, Tan A, Chan A. Impact of brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism on cognition: A systematic review. *Brain Behav*. 2018 Jul;8(7):e01009.
170. Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A, Murayama M, Masaki T, et al. Association Study of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Polymorphism and Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004 Apr 20;28(11):1609–12.
171. Harrisberger F, Spalek K, Smieskova R, Schmidt A, Coyne D, Milnik A, et al. The association of the BDNF Val66Met polymorphism and the hippocampal volumes in healthy humans: A joint meta-analysis of published and new data. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;42:267–78.
172. Frey BN, Walss-Bass C, Stanley JA, Nery FG, Matsuo K, Nicoletti MA, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects prefrontal energy metabolism in bipolar disorder. *Neuroreport*. 2007;18(15):1567–70.
173. Hoefer ME, Pennington DL, Durazzo TC, Mon A, Abé C, Truran D, et al. Genetic and behavioral determinants of hippocampal volume recovery during abstinence from alcohol. *Alcohol*. 2014 Apr 20;48(7):631–8.
174. Nedic G, Nikolac Perkovic M, Nenadic Sviglin K, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2013 Nov 18;40:193–8.
175. Muschler MAN, Heberlein A, Frieling H, Vogel N, Becker C-M, Kornhuber J, et al. Brain-derived neurotrophic factor, Val66Met single nucleotide polymorphism is not associated with alcohol dependence. *Psychiatr Genet*. 2011 Feb;21(1):53–4.
176. Jiang X, Xu K, Hoberman J, Tian F, Marko AJ, Waheed JF, et al. BDNF Variation and Mood Disorders: A Novel Functional Promoter Polymorphism and Val66Met are Associated with Anxiety but Have Opposing Effects. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Jul 16;30(7):1353–61.
177. Suchanek R, Owczarek A, Kowalski J. Association Study Between BDNF C-281A Polymorphism and Paranoid Schizophrenia in Polish Population. *J Mol Neurosci*.

2012 Jan 28;46(1):217–22.

178. Zhu G, Pollak L, Mottagui-Tabar S, Wahlestedt C, Taubman J, Virkkunen M, et al. NPY leu7pro and Alcohol Dependence in Finnish and Swedish Populations. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003 Sep 3;27(1):19–24.
179. Lappalainen J, HR K, Malison R, al et. A functional neuropeptide y leu7pro polymorphism associated with alcohol dependence in a large population sample from the united states. *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Nov 5;59(9):825–31.
180. Mottagui-Tabar S, Prince JA, Wahlestedt C, Zhu G, Goldman D, Heilig M. A Novel Single Nucleotide Polymorphism of the Neuropeptide Y (NPY) Gene Associated With Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Sep 3;29(5):702–7.
181. Koehnke MD, Schick S, Lutz U, Willecke M, Koehnke AM, Kolb W, et al. Severity of alcohol withdrawal symptoms and the T1128C polymorphism of the neuropeptide Y gene. *J Neural Transm (Vienna, Austria 1996)*. 2002;109(11):1423–9.
182. Zill P, Preuss UW, Koller G, Bondy B, Soyka M. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in the Neuropeptide Y Gene: No Evidence for Association With Alcoholism in a German Population Sample. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Sep 3;32(3):430–4.
183. Bhaskar LVKS, Thangaraj K, Kumar KP, Pardhasaradhi G, Singh L, Rao VR. Association between Neuropeptide Y Gene Polymorphisms and Alcohol Dependence: A Case-Control Study in Two Independent Populations. *Eur Addict Res*. 2013 Nov 5;19(6):307–13.
184. Francès F, Guillen M, Verdú F, Portolés O, Castelló A, Sorlí J V, et al. The 1258 G>A polymorphism in the neuropeptide Y gene is associated with greater alcohol consumption in a Mediterranean population. *Alcohol*. 2011;45(2):131–6.
185. JH K, Staley J, Mason G, al et. Γ -aminobutyric acid type a receptors and alcoholism: Intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 May 3;63(9):957–68.
186. Enoch M-A, Hodgkinson CA, Yuan Q, Albaugh B, Virkkunen M, Goldman D. GABRG1 and GABRA2 as Independent Predictors for Alcoholism in Two Populations. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jun 17;34(5):1245–54.
187. Rengifo A, Tapiero C, Spinel C. Receptores GABAA (ácido γ -aminobutírico) y su relación con la dependencia al alcohol. *Ing y Cienc - ing.cienc*. 2005;
188. Park C-S, Park S-Y, Lee C-S, Sohn J-W, Hahn G-H, Kim B-J. Association between alcoholism and the genetic polymorphisms of the GABAA receptor genes on

- chromosome 5q33-34 in Korean population. *J Korean Med Sci.* 2006 Jun;21(3):533–8.
189. Sahni S, Tickoo M, Gupta R, Vaswani M, Ambekar A, Grover T, et al. Association of serotonin and GABA pathway gene polymorphisms with alcohol dependence: A preliminary study. *Asian J Psychiatr.* 2019 Jan;39:169–73.
 190. Olsen RW, Hanchar HJ, Meera P, Wallner M. GABAA receptor subtypes: the “one glass of wine” receptors. *Alcohol.* 2007 Nov 17;41(3):201–9.
 191. Terranova C, Tucci M, Di Pietra L, Ferrara SD. GABA Receptors Genes Polymorphisms and Alcohol Dependence: No Evidence of an Association in an Italian Male Population. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2014 Nov 17;12(2):142.
 192. Mertens S, Benke D, Mohler H. GABAA receptor populations with novel subunit combinations and drug binding profiles identified in brain by alpha 5- and delta-subunit-specific immunopurification. *J Biol Chem.* 1993 Mar 15;268(8):5965–73.
 193. Fritschy J-M, Mohler H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol.* 1995 Aug 14;359(1):154–94.
 194. Bohnsack JP, Patel VK, Morrow AL. Ethanol Exposure Regulates Gabra1 Expression via Histone Deacetylation at the Promoter in Cultured Cortical Neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;363(1):1–11.
 195. Dick DM, Plunkett J, Wetherill LF, Xuei X, Goate A, Hesselbrock V, et al. Association between GABRA1 and drinking behaviors in the collaborative study on the genetics of alcoholism sample. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Jul;30(7):1101–10.
 196. Blednov YA, Jung S, Alva H, Wallace D, Rosahl T, Whiting P-J, et al. Deletion of the alpha 1 or beta 2 Subunit of GABAA Receptors Reduces Actions of Alcohol and Other Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan 1;304(1):30–6.
 197. Lin S-K, Chen C-K, Ball D, Liu H-C, Loh E-W. Gender-specific contribution of the GABA(A) subunit genes on 5q33 in methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J.* 2003;3(6):349–55.
 198. Kumari R, Lakhan R, Kalita J, Misra UK, Mittal B. Association of alpha subunit of GABAA receptor subtype gene polymorphisms with epilepsy susceptibility and drug resistance in north Indian population. *Seizure.* 2010 May 1;19(4):237–41.
 199. Li D, Sulovari A, Cheng C, Zhao H, Kranzler HR, Gelernter J. Association of gamma-aminobutyric acid A receptor α 2 gene (GABRA2) with alcohol use disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2014 Nov 18;39(4):907–18.

200. Chang YT, Sun HS, Fann CSJ, Chang C-J, Liao ZH, Huang JL, et al. Association of the gamma-aminobutyric acid A receptor gene cluster with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Mol Psychiatry*. 2002 Sep 17;7(8):828–9.
201. Song J, Koller DL, Foroud T, Carr K, Zhao J, Rice J, et al. Association of GABAA receptors and alcohol dependence and the effects of genetic imprinting. *Am J Med Genet*. 2003 Feb 15;117B(1):39–45.
202. Petryshen TL, Middleton FA, Tahl AR, Rockwell GN, Purcell S, Aldinger KA, et al. Genetic investigation of chromosome 5q GABAA receptor subunit genes in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005 Dec 20;10(12):1074–88.
203. Edenberg HJ, Dick DM, Xuei X, Tian H, Almasy L, Bauer LO, et al. Variations in GABRA2, Encoding the $\alpha 2$ Subunit of the GABAA Receptor, Are Associated with Alcohol Dependence and with Brain Oscillations. *Am J Hum Genet*. 2004 May 3;74(4):705–14.
204. Covault J, Gelernter J, Hesselbrock V, Nellissery M, Kranzler HR. Allelic and haplotypic association of GABRA2 with alcohol dependence. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Jun 22;129B(1):104–9.
205. Villafuerte S, Heitzeg MM, Foley S, Wendy Yau W-Y, Majczenko K, Zubieta J-K, et al. Impulsiveness and insula activation during reward anticipation are associated with genetic variants in GABRA2 in a family sample enriched for alcoholism. *Mol Psychiatry*. 2012 Nov 17;17(5):511–9.
206. Villafuerte S, Strumba V, Stoltenberg SF, Zucker RA, Burmeister M. Impulsiveness mediates the association between GABRA2 SNPs and lifetime alcohol problems. *Genes Brain Behav*. 2013 Jun 27;12(5):525–31.
207. McKernan RM, Whiting PJ. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci*. 1996 Apr 1;19(4):139–43.
208. Engin E, Benham RS, Rudolph U. An Emerging Circuit Pharmacology of GABAA Receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(8):710–32.
209. Bauer LO, Covault J, Harel O, Das S, Gelernter J, Anton R, et al. Variation in GABRA2 Predicts Drinking Behavior in Project MATCH Subjects. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Sep 3;31(11):1780–7.
210. Uhart M, Weerts EM, McCaul ME, Guo X, Yan X, Kranzler HR, et al. GABRA2 MARKERS MODERATE THE SUBJECTIVE EFFECTS OF ALCOHOL. *Addict Biol*. 2013 May 3;18(2):357–69.
211. Pierucci-Lagha A, Covault J, Feinn R, Nellissery M, Hernandez-Avila C, Oncken C, et al. GABRA2 Alleles Moderate the Subjective Effects of Alcohol, Which are

- Attenuated by Finasteride. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Sep 3;30(6):1193–203.
212. Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, et al. Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):796–800.
 213. Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* (80-). 2000 Oct 6;290(5489):131–4.
 214. Miczek KA, Fish EW, De Almeida RMM, Faccidomo S, Debold JF. Role of alcohol consumption in escalation to violence. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004. p. 278–89.
 215. Villafuerte S, Trucco EM, Heitzeg MM, Burmeister M, Zucker RA. Genetic variation in GABRA2 moderates peer influence on externalizing behavior in adolescents. *Brain Behav*. 2014 Apr 20;4(6):833–40.
 216. Strac DS, Erjavec GN, Perkovic MN, Sviglin KN, Borovecki F, Pivac N. Association of GABAA receptor $\alpha 2$ subunit gene (GABRA2) with alcohol dependence-related aggressive behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015 Dec 3;63:119–25.
 217. Takahashi A, Miczek KA. Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Curr Top Behav Neurosci*. 2014;17:3–44.
 218. Haughey HM, Ray LA, Finan P, Villanueva R, Niculescu M, Hutchison KE. Human γ -aminobutyric acid A receptor $\alpha 2$ gene moderates the acute effects of alcohol and brain mRNA expression. *Genes, Brain Behav*. 2008 May 3;7(4):447–54.
 219. Olfson E, Bierut LJ. Convergence of GWA and candidate gene studies for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012 Sep 3;36(12):2086–94.
 220. Zintzaras E. Gamma-aminobutyric acid A receptor, α -2 (GABRA2) variants as individual markers for alcoholism. *Psychiatr Genet*. 2012 Aug 3;22(4):189–96.
 221. Boyd SJ, Schacht JP, Prisciandaro JJ, Voronin K, Anton RF. Alcohol-Induced Stimulation Mediates the Effect of a GABRA2 SNP on Alcohol Self-Administered among Alcohol-Dependent Individuals. *Alcohol Alcohol*. 2016 Sep;51(5):549–54.
 222. Arias AJ, Covault J, Feinn R, Pond T, Yang B-Z, Ge W, et al. A GABRA2 Variant Is Associated with Increased Stimulation and ‘High’ Following Alcohol Administration. *Alcohol Alcohol*. 2014 Jun 22;49(1):1–9.
 223. Kosobud AEK, Wetherill L, Plawecki MH, Kareken DA, Liang T, Nurnberger JL, et

- al. Adaptation of Subjective Responses to Alcohol is Affected by an Interaction of GABRA2 Genotype and Recent Drinking. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Jun 22;n/a-n/a.
224. Soyka M, Preuss UW, Hesselbrock V, Zill P, Koller G, Bondy B. GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. *J Psychiatr Res*. 2008 May 3;42(3):184–91.
225. Švob Štrac D, Nedić G, Nikolac M, Nenadić Šviglin K, Mück-Šeler D, Pivac N. The GABAA receptor α 2 subunit gene (GABRA2) is associated with alcohol-related behavior. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2012 May 2;13(Suppl 1):A8.
226. Melroy WE, Stephens SH, Sakai JT, Kamens HM, McQueen MB, Corley RP, et al. Examination of genetic variation in GABRA2 with conduct disorder and alcohol abuse and dependence in a longitudinal study. *Behav Genet*. 2014 Jul;44(4):356–67.
227. Pham X, Sun C, Chen X, van den Oord EJCG, Neale MC, Kendler KS, et al. Association study between GABA receptor genes and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety*. 2009;26(11):998–1003.
228. Uhart M, McCaul ME, Oswald LM, Choi L, Wand GS. GABRA6 gene polymorphism and an attenuated stress response. *Mol Psychiatry*. 2004 Nov 15;9(11):998–1006.
229. Sanna A, Congeddu E, Saba L, Porcella A, Marchese G, Ruiu S, et al. The cerebellar GABAA α 6 subunit is differentially modulated by chronic ethanol exposure in normal (R100R) and mutated (Q100Q) sNP rats. *Brain Res*. 2004 Jun 27;998(2):148–54.
230. Gong Y, Wu CN, Xu J, Feng G, Xing QH, Fu W, et al. Polymorphisms in microRNA target sites influence susceptibility to schizophrenia by altering the binding of miRNAs to their targets. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013 Oct;23(10):1182–9.
231. Gonda X, Sarginson J, Eszlari N, Petschner P, Toth ZG, Baksa D, et al. A new stress sensor and risk factor for suicide: the T allele of the functional genetic variant in the GABRA6 gene. *Sci Rep*. 2017;7(1):12887.
232. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GAS. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Jan;48:70–91.
233. Association between variants at the GABAA β 2, GABAA α 6 and GABAA γ 2 gene cluster and alcohol dependence in a Scottish population. , *Publ online* 16 Novemb 1999; | doi101038/sj.mp4000554. 1999 Oct 2;4(6).

234. Sander T, Ball D, Murray R, Patel J, Samochowiec J, Winterer G, et al. Association Analysis of Sequence Variants of the GABAA α 6, β 2, and γ 2 Gene Cluster and Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jun 27;23(3):427–31.
235. Pu M, Zhang Z, Xu Z, Shi Y, Geng L, Yuan Y, et al. Influence of genetic polymorphisms in the glutamatergic and GABAergic systems and their interactions with environmental stressors on antidepressant response. *Pharmacogenomics*. 2013 May 3;14(3):277–88.
236. Ren H, Guan L, Zhao L, Lin Y, Wang Y, Yang Z, et al. Contribution of genes in the GABAergic pathway to bipolar disorder and its executive function deficit in the Chinese Han population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2018 Jan 1;177(1):50–67.
237. Huo R, Wei Z, Xiong Y, Jiang J, Liu Y, Yan Y, et al. Association of dopamine receptor D1 (DRD1) polymorphisms with risperidone treatment response in Chinese schizophrenia patients. *Neurosci Lett*. 2015 May 2;584:178–83.
238. Paul ML, Graybiel AM, David JC, Robertson HA. D1-like and D2-like dopamine receptors synergistically activate rotation and c-fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 1992 May 2;12(10):3729–42.
239. El-Ghundi M, George SR, Drago J, Fletcher PJ, Fan T, Nguyen T, et al. Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. *Eur J Pharmacol*. 1998 Sep 2;353(2–3):149–58.
240. Fanelli RR, Robinson DL. Dopamine D1 receptor blockade impairs alcohol seeking without reducing dorsal striatal activation to cues of alcohol availability. *Brain Behav*. 2015 Apr 21;5(2).
241. Limosin F, Loze J-Y, Rouillon F, Adès J, Gorwood P. Association Between Dopamine Receptor D1 Gene Dde I polymorphism and Sensation Seeking in Alcohol-Dependent Men. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003 May 3;27(8):1226–8.
242. Abidin SZ, Tan EL, Chan S-C, Jaafar A, Lee AX, Hamid MHNA, et al. DRD and GRIN2B polymorphisms and their association with the development of impulse control behaviour among Malaysian Parkinson's disease patients. *BMC Neurol*. 2015 May 2;15(1):59.
243. Celorrio D, Muñoz X, Amiano P, Dorronsoro M, Bujanda L, Sánchez M-J, et al. Influence of Dopaminergic System Genetic Variation and Lifestyle Factors on Excessive Alcohol Consumption. *Alcohol Alcohol*. 2016 May 1;51(3):258–67.
244. Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. Identification and characterization of ANKK1: A novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band

- 11q23.1. *Hum Mutat.* 2004;23(6):540–5.
245. Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Wong C, et al. Reinforcing Effects of Psychostimulants in Humans Are Associated with Increases in Brain Dopamine and Occupancy of D2 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Sep 2;291(1):409–15.
246. Volkow ND, Wang G-J, Telang F, Fowler JS, Logan J, Jayne M, et al. Profound Decreases in Dopamine Release in Striatum in Detoxified Alcoholics: Possible Orbitofrontal Involvement. *J Neurosci.* 2007;27(46):12700–6.
247. Ravan S, Martinez D, Slifstein M, Abi-Dargham A. Molecular imaging in alcohol dependence. *Handb Clin Neurol.* 2014;125:293–311.
248. High levels of dopamine d2 receptors in unaffected members of alcoholic families: Possible protective factors. *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Sep;63(9):999–1008.
249. Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Buchholz HG, Gründer G, Kumakura Y, et al. Correlation of Alcohol Craving With Striatal Dopamine Synthesis Capacity and D2/3 Receptor Availability: A Combined [18F]DOPA and [18F]DMFP PET Study in Detoxified Alcoholic Patients. *Am J Psychiatry.* 2005 Sep 2;162(8):1515–20.
250. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 2;12(3):205–16.
251. Hirvonen M, Laakso A, Någren K, Rinne JO, Pohjalainen T, Hietala J. C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry.* 2004 Sep 3;9(12):1060–1.
252. Hill SY, Hoffman EK, Zezza N, Thalamuthu A, Weeks DE, Matthews AG, et al. Dopaminergic Mutations: Within-Family Association and Linkage in Multiplex Alcohol Dependence Families. *Am J Med Genet.* 2008 Sep 3;147B(4):517–26.
253. Swagell CD, Lawford BR, Hughes IP, Voisey J, Feeney GFX, Daal A van, et al. DRD2 C957T and TaqIA Genotyping Reveals Gender Effects and Unique Low-Risk and High-Risk Genotypes in Alcohol Dependence. *Alcohol Alcohol.* 2012 May 2;47(4):397–403.
254. Samaan Z, Bawor M, Dennis BB, Plater C, Varenbut M, Daiter J, et al. Genetic influence on methadone treatment outcomes in patients undergoing methadone maintenance treatment for opioid addiction: a pilot study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014 May 2;10:1503–8.

255. Miguel-Hidalgo JJ. The role of glial cells in drug abuse. *Curr Drug Abuse Rev.* 2009 Jan;2(1):72–82.
256. Fossella J, Green AE, Fan J. Evaluation of a structural polymorphism in the ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1) gene and the activation of executive attention networks. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2006;6(1):71–8.
257. McAllister TW. Genetic factors in traumatic brain injury. In: Jordan Grafman AMS, editor. *Traumatic Brain Injury, Part II.* Elsevier; 2015. p. 723–39.
258. Munafò 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 Sep 2;12(5):454–61.
259. Smith L, Watson M, Gates S, Ball D, Foxcroft D. Meta-Analysis of the Association of the Taq1A Polymorphism with the Risk of Alcohol Dependency: A HuGE Gene-Disease Association Review. *Am J Epidemiol.* 2008 Sep 2;167(2):125–38.
260. Prasad P, Ambekar A, Vaswani M. Case–control association analysis of Dopamine receptor polymorphisms in alcohol dependence: a pilot study in Indian males. *BMC Res Notes.* 2013 Apr 30;6:418.
261. Katsarou M-S, Karakonstantis K, Demertzis N, Vourakis E, Skarpathioti A, Nosyrev AE, et al. Effect of single-nucleotide polymorphisms in ADH1B, ADH4, ADH1C, OPRM1, DRD2, BDNF, and ALDH2 genes on alcohol dependence in a Caucasian population. *Pharmacol Res Perspect.* 2017 Aug;5(4).
262. Haberstick BC, Timberlake D, Smolen A, Sakai JT, Hopfer CJ, Corley RP, et al. Between and within-family association test of the dopamine receptor D2 Taq1A polymorphism and alcohol abuse and dependence in a general population sample of adults. *J Stud Alcohol Drugs.* 2007 Sep 3;68(3):362–70.
263. Noble EP, Blum K, Ritchie T, Montgomery A, Sheridan PJ. Allelic Association of the D2 Dopamine Receptor Gene With Receptor-Binding Characteristics in Alcoholism or Gene ism. *Arch Gen Psychiatry.* 1991 Jul 1;48(7):648.
264. Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics.* 1997 Dec;7(6):479–84.
265. Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, et al. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Jun;15(6):387–91.

266. Lawford BR, Young RM, Rowell JA, Qualichefski J, Fletcher BH, Syndulko K, et al. Bromocriptine in the treatment of alcoholics with the D2 dopamine receptor A1 allele. *Nat Med.* 1995;1(4):337–41.
267. Hoenicka J, Quiñones-Lombraña A, España-Serrano L, Alvira-Botero X, Kremer L, Pérez-González R, et al. The ANKK1 Gene Associated with Addictions Is Expressed in Astroglial Cells and Upregulated by Apomorphine. *Biol Psychiatry.* 2010 Jan 1;67(1):3–11.
268. Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 1991 Nov 15;564(2):203–19.
269. Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, et al. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci.* 2000 Dec 1;20(23):8677–84.
270. Rabiner EA, Slifstein M, Nobrega J, Plisson C, Huiban M, Raymond R, et al. In vivo quantification of regional dopamine-D3 receptor binding potential of (+)-PHNO: Studies in non-human primates and transgenic mice. *Synapse.* 2009 Sep;63(9):782–93.
271. Tziortzi AC, Searle GE, Tzimopoulou S, Salinas C, Beaver JD, Jenkinson M, et al. Imaging dopamine receptors in humans with [11C]-(+)-PHNO: dissection of D3 signal and anatomy. *Neuroimage.* 2011 Jan 1;54(1):264–77.
272. Savitz J, Hodgkinson CA, Martin-Soelch C, Shen P-H, Szczepanik J, Nugent A, et al. The Functional DRD3 Ser9Gly Polymorphism (rs6280) Is Pleiotropic, Affecting Reward as Well as Movement. Reif A, editor. *PLoS One.* 2013 Jan 24;8(1):e54108.
273. Vengeliene V, Leonardi-Essmann F, Perreau-Lenz S, Gebicke-Haerter P, Drescher K, Gross G, et al. The dopamine D3 receptor plays an essential role in alcohol-seeking and relapse. *FASEB J.* 2006 Nov 1;20(13):2223–33.
274. Agrawal A, Wetherill L, Bucholz KK, Kramer J, Kuperman S, Lynskey MT, et al. Genetic influences on craving for alcohol. *Addict Behav.* 2013 Nov 17;38(2):1501–8.
275. Novak G, LeBlanc M, Zai C, Shaikh S, Renou J, DeLuca V, et al. Association of polymorphisms in the BDNF, DRD1 and DRD3 genes with tobacco smoking in schizophrenia. *Ann Hum Genet.* 2010 Apr 25;74(4):291–8.
276. Wei J, Chu C, Wang Y, Yang Y, Wang Q, Li T, et al. Association study of 45 candidate genes in nicotine dependence in Han Chinese. *Addict Behav.* 2012

May 1;37(5):622–6.

277. Wiesbeck GA, Dürsteler-MacFarland KM, Wurst FM, Walter M, Petitjean S, Müller S, et al. GENETIC STUDY: No association of dopamine receptor sensitivity in vivo with genetic predisposition for alcoholism and DRD2/DRD3 gene polymorphisms in alcohol dependence. *Addict Biol.* 2006 Sep 3;11(1):72–5.
278. Lee M-S, Ryu S-H. No association between the dopamine D3 receptor gene and Korean alcohol dependence. *PsychiatricGenetics.* 2002 Sep 3;12(3):173–6.
279. Qi X-L, Xuan J-F, Xing J-X, Wang B-J, Yao J. No association between dopamine D3 receptor gene Ser9Gly polymorphism (rs6280) and risk of schizophrenia: an updated meta-analysis. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017;13:2855–65.
280. Light KJ, Joyce PR, Luty SE, Mulder RT, Frampton CMA, Joyce LRM, et al. Preliminary evidence for an association between a dopamine D3 receptor gene variant and obsessive-compulsive personality disorder in patients with major depression. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Jun 5;141B(4):409–13.
281. Bombin I, Arango C, Mayoral M, Castro-Fornieles J, Gonzalez-Pinto A, Gonzalez-Gomez C, et al. DRD3, but not COMT or DRD2, genotype affects executive functions in healthy and first-episode psychosis adolescents. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Sep 5;147B(6):873–9.
282. Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Li MD. A functional polymorphism, rs6280, in *DRD3* is significantly associated with nicotine dependence in European-American smokers. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2008 Oct 5;147B(7):1109–15.
283. Talkowski ME, Mansour H, Chowdari K V., Wood J, Butler A, Varma PG, et al. Novel, Replicated Associations Between Dopamine D3 Receptor Gene Polymorphisms and Schizophrenia in Two Independent Samples. *Biol Psychiatry.* 2006 Sep 15;60(6):570–7.
284. Ragia G, Veresies I, Veresie L, Veresies K, Manolopoulos VG. Association study of DRD2 A2/A1, DRD3 Ser9Gly, DβH –1021C>T, OPRM1 A118G and GRIK1 rs2832407C>A polymorphisms with alcohol dependence. *Drug Metab Pers Ther.* 2016 Jan 1;31(3):143–50.
285. Kang S-G, Lee B-H, Lee J-S, Chai YG, Ko K-P, Lee H-J, et al. DRD3 Gene rs6280 Polymorphism May Be Associated with Alcohol Dependence Overall and with Lesch Type I Alcohol Dependence in Koreans. *Neuropsychobiology.* 2014 Apr 30;69(3):140–6.
286. Costa J. [Real-time PCR]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004 May;22(5):299–304;

quiz 305.

287. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol.* 1995 Sep;12(5):921–7.
288. Variations dbSNP SG. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs6265 [Internet]. Pubmed. [consultado 1/08/2018]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6265
289. Finckh U. Dopamine D2 receptor gene and alcoholism: association studies. In Agarwal D, Seitz H (eds). *Alcohol in Health and Disease*. New York: Marcel: 2001. p 151–76.
290. dbSNP Short Genetic Variations. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs16139 [Internet]. Pubmed. [consultado 13/08/2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=16139
291. rs9785023 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs9785023>
292. rs1037715 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1037715>
293. rs2279020 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2279020>
294. rs279858 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs279858#frequency_tab
295. rs168697 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs168697#frequency_tab
296. rs9291283 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs9291283#frequency_tab
297. rs894269 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs894269#frequency_tab
298. rs2197414 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2197414>

299. rs1992647 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1992647>
300. rs3219151 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3219151>
301. rs4867798 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4867798>
302. rs6277 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6277>
303. rs1799978 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799978>
304. rs1800497 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800497>
305. rs6280 RefSNP Report - dbSNP - The National Center for Biotechnology [Internet]. [consultado 12/08/2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs6280>.
306. Hou J, Seneviratne C, Su X, Taylor J, Johnson B, Wang XQ, et al. Subgroup Identification in Personalized Treatment of Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Jul 1;39(7):1253–9.
307. Tsai S-J. Critical Issues in BDNF Val66Met Genetic Studies of Neuropsychiatric Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:156.
308. Notaras M, Hill R, van den Buuse M. The BDNF gene Val66Met polymorphism as a modifier of psychiatric disorder susceptibility: progress and controversy. *Mol Psychiatry*. 2015 Aug 31;20(8):916–30.
309. Iamjan S, Thanoi S, Watiktinkorn P, Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP. BDNF (Val66Met) genetic polymorphism is associated with vulnerability for methamphetamine dependence. *Pharmacogenomics*. 2015 Sep;16(14):1541–5.
310. Raivio N, Miettinen P, Kiianmaa K. Innate BDNF expression is associated with

- ethanol intake in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Brain Res.* 2014 Apr 20;1579:74–83.
311. Haerian BS. *BDNF* rs6265 polymorphism and drug addiction: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2013 Dec;14(16):2055–65.
 312. Cheah S-Y, Lawford BR, Young RM, Connor JP, Morris CP, Voisey J. *BDNF* SNPs Are Implicated in Comorbid Alcohol Dependence in Schizophrenia But Not in Alcohol-Dependent Patients Without Schizophrenia. *Alcohol Alcohol.* 2014 Apr 20;49(5):491–7.
 313. Shin S, Stewart R, Ferri CP, Kim J-M, Shin I-S, Kim S-W, et al. An investigation of associations between alcohol use disorder and polymorphisms on *ALDH2*, *BDNF*, *5-HTTLPR*, and *MTHFR* genes in older Korean men. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2010 Apr 20;25(5):441–8.
 314. Forero DA, López-León S, Shin HD, Park BL, Kim D-J. Meta-analysis of six genes (*BDNF*, *DRD1*, *DRD3*, *DRD4*, *GRIN2B* and *MAOA*) involved in neuroplasticity and the risk for alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2015 Feb 16;
 315. Colzato LS, Van der Does AJW, Kouwenhoven C, Elzinga BM, Hommel B. *BDNF* Val66Met polymorphism is associated with higher anticipatory cortisol stress response, anxiety, and alcohol consumption in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology.* 2011 Apr 20;36(10):1562–9.
 316. Klimkiewicz A, Mach A, Jakubczyk A, Klimkiewicz J, Wnorowska A, Kopera M, et al. *COMT* and *BDNF* Gene Variants Help to Predict Alcohol Consumption in Alcohol-dependent Patients. *J Addict Med.* 2017;11(2):114–8.
 317. Heberlein A, Muschler M, Wilhelm J, Frieling H, Lenz B, Gröschl M, et al. *BDNF* and *GDNF* serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2010 Apr 19;34(6):1060–4.
 318. Casey BJ, Soliman F, Bath KG, Glatt CE. Imaging Genetics and Development: Challenges and Promises. *Hum Brain Mapp.* 2010 Apr 20;31(6):838–51.
 319. Cruz-Fuentes CS, Benjet C, Martínez-Levy GA, Pérez-Molina A, Briones-Velasco M, Suárez-González J. *BDNF* Met66 modulates the cumulative effect of psychosocial childhood adversities on major depression in adolescents. *Brain Behav.* 2014 Mar;4(2):290–7.
 320. Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, et al. A genetic variant *BDNF* polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science.* 2010 Feb 12;327(5967):863–6.
 321. Su N, Zhang L, Fei F, Hu H, Wang K, Hui H, et al. The brain-derived neurotrophic

- factor is associated with alcohol dependence-related depression and antidepressant response. *Brain Res.* 2011 Apr 20;1415:119–26.
322. Wojnar M, Brower KJ, Strobbe S, Ilgen M, Matsumoto H, Nowosad I, et al. Association between Val66Met brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism and post-treatment relapse in alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009 Apr;33(4):693–702.
 323. Chen Z-Y, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao C-J, et al. Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. *Science (80-)*. 2006 Oct 6;314(5796):140–3.
 324. Bath KG, Jing DQ, Dincheva I, Neeb CC, Pattwell SS, Chao M V, et al. BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacology.* 2012 Apr 4;37(5):1297–304.
 325. Grzywacz A, Samochowiec A, Ciechanowicz A, Samochowiec J. Family-based study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism in alcohol dependence. *Pharmacol reports PR.* 2010;62(5):938–41.
 326. Šerý O, Šťastný F, Zvolský P, Hlinomazová Z, Balcar VJ. Association between Val66Met polymorphism of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene and a deficiency of colour vision in alcohol-dependent male patients. *Neurosci Lett.* 2011 Nov 18;499(3):154–7.
 327. Gratacòs M, González JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met and Psychiatric Disorders: Meta-Analysis of Case-Control Studies Confirm Association to Substance-Related Disorders, Eating Disorders, and Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2007;61(7):911–22.
 328. Sim MS, Mohamed Z, Hatim A, Rajagopal VL, Habil MH. Association of brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism with methamphetamine dependence in a Malaysian population. *Brain Res.* 2010 Oct 21;1357:91–6.
 329. Lee S-Y, Chen S-L, Wang Y-S, Chang Y-H, Huang S-Y, Tzeng N-S, et al. COMT and BDNF interacted in bipolar II disorder not comorbid with anxiety disorder. *Behav Brain Res.* 2013 Jan 15;237:243–8.
 330. Mandolini GM, Lazzaretti M, Pighi A, Delvecchio G, Soares JC, Brambilla P. The impact of BDNF Val66Met polymorphism on cognition in Bipolar Disorder: A review. *J Affect Disord.* 2019 Jan 15;243:552–8.
 331. Sharma S, Graham R, Rohde R, Ceballos NA. Stress-induced change in serum BDNF is related to quantitative family history of alcohol use disorder and age at

- first alcohol use. *Pharmacol Biochem Behav.* 2017 Feb 1;153:12–7.
332. Wetherill L, Schuckit MA, Hesselbrock V, Xuei X, Liang T, Dick DM, et al. Neuropeptide Y receptor genes are associated with alcohol dependence, alcohol withdrawal phenotypes, and cocaine dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008 Dec;32(12):2031–40.
 333. KALLIO J, PESONEN U, KAIPPIO K, KARVONEN MK, JAAKKOLA U, HEINONEN OJ, et al. Altered intracellular processing and release of neuropeptide Y due to leucine 7 to proline 7 polymorphism in the signal peptide of preproneuropeptide Y in humans. *FASEB J.* 2001 May 1;15(7):1242–4.
 334. Kallio J, Pesonen U, Jaakkola U, Karvonen MK, Helenius H, Koulu M. Changes in Diurnal Sympathoadrenal Balance and Pituitary Hormone Secretion in Subjects with Leu7Pro Polymorphism in the Prepro-Neuropeptide Y. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul 1;88(7):3278–83.
 335. Ilveskoski E, Kajander OA, Lehtimäki T, Kunnas T, Karhunen PJ, Heinälä P, et al. Association of Neuropeptide Y Polymorphism With the Occurrence of Type 1 and Type 2 Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001 Sep 3;25(10):1420–2.
 336. Portolés O, Sorlí JV, González JI, Ruiz de la Fuente S, Ramírez JB, Corella D. Baja prevalencia del polimorfismo Leu7Pro en el péptido señal del preproneuropéptido Y en la población mediterránea española. *Med Clin (Barc).* 2003 Jan;120(9):337–9.
 337. Bhaskar LVKS, Thangaraj K, Shah AM, Pardhasaradhi G, Praveen Kumar K, Reddy AG, et al. Allelic variation in the NPY gene in 14 Indian populations. *J Hum Genet.* 2007 Jun 25;52(7):592–8.
 338. Dick DM, Edenberg HJ, Xuei X, Goate A, Hesselbrock V, Schuckit M, et al. No association of the GABAA receptor genes on chromosome 5 with alcoholism in the collaborative study on the genetics of alcoholism sample. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2005 Jun 27;132B(1):24–8.
 339. Hancher HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci.* 2005 Mar;8(3):339–45.
 340. Loh E-W, Ball D. Role of the GABA_A β 2, GABA_A α 6, GABA_A α 1 and GABA_A γ 2 receptor subunit genes cluster in drug responses and the development of alcohol dependence. *Neurochem Int.* 2000 Nov 18;37(5):413–23.
 341. 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 May 2;35(3):400–7.

342. Lind PA, Macgregor S, Agrawal A, Montgomery GW, Heath AC, Martin NG, et al. The role of GABRA2 in alcohol dependence, smoking, and illicit drug use in an Australian population sample. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Oct;32(10):1721–31.
343. Malhotra S, Basu D, Khullar M, Ghosh A, Chugh N. Candidate genes for alcohol dependence: A genetic association study from India. *Indian J Med Res*. 2016 Nov;144(5):689.
344. Enoch M-A, Schwartz L, Albaugh B, Virkkunen M, Goldman D. Dimensional anxiety mediates linkage of GABRA2 haplotypes with alcoholism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006 Sep 5;141B(6):599–607.
345. Dixon CI, Morris H V, Breen G, Desrivieres S, Jugurnauth S, Steiner RC, et al. Cocaine effects on mouse incentive-learning and human addiction are linked to $\alpha 2$ subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 17;107(5):2289–94.
346. Ravindran CRM, Ticku MK. Tyrosine Kinase Phosphorylation of GABAA Receptor $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ Subunits Following Chronic Intermittent Ethanol (CIE) Exposure of Cultured Cortical Neurons of Mice. *Neurochem Res*. 2006 Feb 25;31(9):1111–8.
347. Rosmond R, Bouchard C, Björntorp P. Association between a variant at the GABA(A)alpha6 receptor subunit gene, abdominal obesity, and cortisol secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun 24;967(1):566–70.
348. Hipson WE, Fisher DJ. The association between acute stress-related insomnia and alcohol use. *Sleep Heal*. 2016 Sep;2(3):246–52.
349. Becker HC. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on drinking. *Neuropharmacology*. 2017 Aug 1;122:115–26.
350. Anghelescu I, Germeyer S, Müller MJ, Klawe C, Singer P, Dahmen N, et al. No Association Between the Dopamine D2 Receptor Taq I A1 Allele and Earlier Age of Onset of Alcohol Dependence According to Different Specified Criteria. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 Sep 3;25(6):805–9.
351. Bühler K-M, Giné E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, de Fonseca FR, López-Moreno JA. Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol*. 2015 Apr 20;n/a-n/a.
352. Lee SH, Lee B-H, Lee J-S, Chai YG, Choi MR, Han DMR, et al. The Association of DRD2 -141C and ANKK1 TaqIA Polymorphisms with Alcohol Dependence in Korean Population Classified by the Lesch Typology. *Alcohol Alcohol*. 2013 Nov 17;48(4):426–32.

353. Wang F, Simen A, Arias A, Lu Q-W, Zhang H. A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. *Hum Genet.* 2013 Oct 2;132(3):347–58.
354. Ponce G, Jimenez-Arriero MA, Rubio G, Hoenicka J, Ampuero I, Ramos JA, et al. The A1 allele of the DRD2 gene (TaqI A polymorphisms) is associated with antisocial personality in a sample of alcohol-dependent patients. *Eur Psychiatry.* 2003 Oct 3;18(7):356–60.
355. Berggren U, Fahlke C, Berglund KJ, Wadell K, Zetterberg H, Blennow K, et al. Dopamine D2 receptor genotype is associated with increased mortality at a 10-year follow-up of alcohol-dependent individuals. *Alcohol Alcohol.* 2010;45(1):1–5.
356. Samochowiec J, Kucharska-Mazur J, Grzywacz A, Pelka-Wysiecka J, Mak M, Samochowiec A, et al. Genetics of Lesch's typology of alcoholism. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2008 Feb 15;32(2):423–7.
357. Prasad P, Ambekar A, Vaswani M. Dopamine D2 receptor polymorphisms and susceptibility to alcohol dependence in Indian males: a preliminary study. *BMC Med Genet.* 2010 Feb 11;11:24.
358. Berggren U, Fahlke C, Aronsson E, Karanti A, Eriksson M, Blennow K, et al. The taqI DRD2 A1 allele is associated with alcohol-dependence although its effect size is small. *Alcohol Alcohol.* 2006;41(5):479–85.
359. Ponce G, Hoenicka J, Jiménez-Arriero MA, Rodríguez-Jiménez R, Aragüés M, Martín-Suñé N, et al. DRD2 and ANKK1 genotype in alcohol-dependent patients with psychopathic traits: association and interaction study. *Br J Psychiatry.* 2008 May 2;193(2):121–5.
360. Kraschewski A, Reese J, Anghelescu I, Winterer G, Schmidt LG, Gallinat J, et al. Association of the dopamine D2 receptor gene with alcohol dependence: haplotypes and subgroups of alcoholics as key factors for understanding receptor function: *Pharmacogenet Genomics.* 2009 Oct 3;19(7):513–27.
361. Ponce G, Pérez-González R, Aragüés M, Palomo T, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero MA, et al. The ANKK1 kinase gene and psychiatric disorders. *Neurotox Res.* 2009;16(1):50–9.
362. Frank MJ, Moustafa AA, Haughey HM, Curran T, Hutchison KE. Genetic triple dissociation reveals multiple roles for dopamine in reinforcement learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 9;104(41):16311–6.
363. Koeneke A, Ponce G, Troya-Balseca J, Palomo T, Hoenicka J. Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 gene, and addiction vulnerability. Vol. 21,

International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.

364. Yang B-Z, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X, Gelernter J. Association of haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 to alcohol dependence in independent case–control and family samples. *Hum Mol Genet.* 2007 Sep 22;16(23):2844–53.
365. Yang B-Z, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X, Gelernter J. Haplotypic Variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 Are Associated With Comorbid Alcohol and Drug Dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008 Sep 3;32(12):2117–27.
366. Pombo S, Lesch OM. The Alcoholic Phenotypes among Different Multidimensional Typologies: Similarities and Their Classification Procedures. *Alcohol Alcohol.* 2009 Sep 3;44(1):46–54.
367. Park C Il, Kim HW, Hwang SS, Kang JI, Kim SJ. Influence of dopamine-related genes on craving, impulsivity, and aggressiveness in Korean males with alcohol use disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2019 Sep 26;
368. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul 1;67(1):170–81.
369. Zuo L, Tan Y, Zhang X, Wang X, Krystal J, Tabakoff B, et al. A New Genomewide Association Meta-Analysis of Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 Aug 3;39(8):1388–95.
370. Akbar M, Egli M, Cho YE, Song BJ, Noronha A. Medications for alcohol use disorders: An overview. Vol. 185, *Pharmacology and Therapeutics.* Elsevier Inc.; 2018. p. 64–85.