

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS 5HTTLPR Y DRD4 EN ADULTOS DEPENDIENTES A LA NICOTINA

Vargas-Quintana Daniel¹, Aguilar-Zavala Herlinda²

¹Universidad de Guanajuato, daniel_vargas@hotmail.es, ² Universidad de Guanajuato, linda_az99@hotmail.com

RESUMEN.

Según la oms el tabaquismo es problema de salud con elevada morbi-mortalidad; los polimorfismos 5httlpr y drd4 se relacionan con rasgos impulsivos, déficit cognitivos y consumo de tabaco-alcohol. Aplicamos stroop color word, escala desbalance esfuerzo-recompensa y rasgos antisociales en 16 fumadores y 14 no fumadores, mediante muestra sanguínea se extrajo adn, vía pcr se realizó genotipificación de las variantes polimórficas mencionados, para analizar la influencia genética con el estrés, la cognición y rasgos antisociales. Resultados y conclusiones: los fumadores presentan rasgos antisociales; no encontramos diferencias cognitivas; mujeres fumadoras perciben mayor estrés laboral, fumadores perciben menos recompensa. Sobre el drd4 solo un caso sl. Sobre el 5httlpr el polimorfismo sl y ll están mayormente presentes en fumadores.

PALABRAS CLAVE Tabaquismo, genética, cognición

INTRODUCCION.

Un problema de salud pública mundial es el consumo de tabaco. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tabaquismo representa la segunda causa principal de muerte en el mundo; esto supone casi cinco millones de muertes cada año. Los cálculos de la OMS señalan que para el año 2030 será la mayor causa de mortalidad y causará el doble de defunciones que las actuales, esto es, cerca de 10 millones de muertes por año (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2012 y 2006). En cuanto al número mundial de fumadores, alrededor de 1,300 millones de personas consumen tabaco; casi 1,000 millones son hombres y 250 millones son mujeres (AMERICAN CANCER SOCIETY 2003). Si bien en México se encontró que 30% de las personas que fallecieron en 1998 en la delegación Coyoacán había fumado durante los últimos 10 años de su vida y que 18% fumó durante el año anterior al deceso (TOVAR-GUZMÁN 2002; TAPIA 1995). Se calculó un riesgo atribuible por tabaquismo de 45% en la población general para las enfermedades del sistema circulatorio (angina de pecho, hemorragia cerebral, aterosclerosis, embolia y trombosis arteriales), de 60% para las enfermedades del sistema respiratorio y de 85% para las neoplasias (KURI 2002).

Pese al esfuerzo por combatir el tabaquismo a nivel mundial, la dependencia a la nicotina (principal componente psicoactivo del tabaco), lleva a mucha gente a continuar fumando; por lo que se es indispensable entender las bases genéticas que delinear los mecanismos involucrados con la dependencia a la nicotina, y así fomentar nuevos tratamientos más eficaces para combatir esta epidemia.

Mucho de los esfuerzos en investigación ha sido dirigido hacia clarificar la influencia de los factores genéticos sobre el riesgo de dependencia a la nicotina por la influencia inicial de la sensibilidad a la recompensa aguda y los efectos de reforzamiento de la nicotina.

En un estudio reciente donde se examinó la asociación de polimorfismos genéticos específicos con la sensibilidad inicial a la administración aguda a la nicotina en adultos jóvenes no fumadores, se encontró que la sensibilidad inicial a la nicotina está asociada con variantes específicas relacionadas con la función dopaminérgica, especialmente en hombres, sugieren que la presencia de los 7 alelos del polimorfismo DRD4 del gen del receptor de dopamina D4 están asociados con sensibilidad incrementada a los efectos adversos de la nicotina (PERKINS 2008). Estos hallazgos pueden demostrar que la variabilidad en la sensibilidad inicial a la nicotina es un mecanismo por lo que los factores genéticos promueven vulnerabilidad al establecimiento de la dependencia a la nicotina. Además, Neuman 2007 sugiere que los niños genéticamente susceptibles a la nicotina por presentar el polimorfismo DRD4, expuestos prenatalmente al tabaco, presentaron mayor riesgo de desencadenar un Desorden de Hiperactividad con Déficit de Atención, en comparación de aquellos que no presentaron el polimorfismo (NEUMAN 2007).

Estudios humanos, demuestran que el 5HTTLPR modera la influencia del estrés sobre la depresión, y por tanto resulta ser un factor de riesgo para el alcoholismo (WONNACOTT 2000). Los resultados de estas investigaciones sugieren una interacción potencial entre la variación en el transportador de serotonina y la experiencia temprana y vulnerabilidad a la dependencia al alcohol (BARR 2004). Así mismo, se ha encontrado que los niveles de 5-HIAA en el fluido cerebroespinal están asociados con la conducta de búsqueda de alcohol, en humanos y en modelos animales, esto en animales con genotipo L/S (BENNETT 2002).

Se ha sugerido que la variante "S" polimórfica del gen 5HTTLPR está asociada con el establecimiento de la dependencia a la nicotina en adolescentes (GERRA 2005). Además está misma variante polimórfica ha sido relacionada en hombres adultos, con conductas antisociales, impulsividad y violencia (CASPI 2003; ELEY 2004; GRABE 2005; JACOBS 2006; KAUFMAN 2004; KAUFMAN 2006; KAUFMAN 2006b; WILHELM 2006; ZALSMAN 2006). En adultos jóvenes caracterizados con el genotipo SS y con bajo nivel socioeconómico resultaron ser especialmente vulnerables a

desarrollar rasgos antisociales, estos rasgos antisociales son evaluados con la aplicación del Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID) (LYONS-RUTH 2007).

La característica esencial del trastorno antisocial de la personalidad es un patrón general de desprecio y violación de los derechos de los demás, que comienza en la infancia o el principio de la adolescencia y continúa en la edad adulta, éstos generalmente frecuentemente engañan y manipulan con tal de conseguir provecho o pacer personales.

En este sentido, es sabido que la exposición al tabaco puede predecir mayor actividad, impulsividad, delincuencia y conductas agresivas en niños y adolescentes, así como mayor déficit de las respuestas que demandan atención y memoria (LANGLEY 2007; HUIJBREGTS 2008; LEWIS 2007; JOHANSSON 2008; ROZA 2008). Además, niños con exposición al cigarro presentaron mayores déficits de la atención selectiva en respuesta a una prueba de Stroop. A sí mismo, mujeres adultas jóvenes con genotipo homocigoto para la variante S del polimorfismo 5HTTLPR, a las que se les aplicó un test de Stroop colors experimentaron mayor reactividad cardiaca en comparación con los hombres con el mismo genotipo y con mujeres con genotipo heterocigoto u homocigoto para la variante L. (MCCAFFERY 2003).

METODOS Y MATERIALES

1.- Aplicación de instrumentos: Los participantes del estudio fueron captados aleatoriamente para la aplicación de cuestionarios y para la aplicación de la prueba de Stroop Color-Word Interference Test; previa autorización del consentimiento informado.

2.- Muestra sanguínea: Se les tomará una muestra sanguínea (10 ml.) para la extracción de DNA y el posterior análisis polimórfico.

Extracción de DNA genómico de glóbulos blancos por procedimiento de fenol-cloroformo.

Análisis de polimorfismos genéticos:

1.- Genotipificación del sitio 5HTTLPR mediante PCR: El DNA geonómico (200ng) se amplificará en una mezcla total de reacción de 30 μ L, conteniendo los siguientes componentes: 1 μ L de primer con sentido (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC) y 1 μ L de primer antisentido (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC) (Biotech AG.), 1 μ L de desoxirribonucleotidos (Invitrogen), conteniendo la dGTP/7-deaza-2'-dGTP=1/1 (USB Corp. USA); MgCl₂ 2nmol/L, 1U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y 3 μ L de Buffer.

El programa de amplificación precedido de una desnaturalización inicial a 98°C por 2.5min. Seguido de 40 ciclos a: 98°C por 45s, 55°C por 45s, y 72°C por 90s y 5 minutos de extensión final a 72°C (Peltier Thermocycler: MJ Research, Inc., WaterTown, MA). La visualización de los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%. La delección de las 44 pb se designó como variante "s" o "corto", dada por un producto de amplificación de 484 pb y la inserción de las 44 pb como variante "l" o "larga" cuyo producto de amplificación fue de 528pb. Por lo que los 3 posibles genotipos son "s/s" homocigotos, "l/s" heterocigotos y "l/l" homocigotos.

2.- Genotipificación del sitio DRD4 mediante PCR: El DNA geonómico se amplificará en una mezcla total de reacción de entre 30 μ L y 50 μ L, conteniendo los siguientes componentes: primer específicos con sentido y primer específicos antisentido, mezcla de desoxirribonucleotidos (Invitrogen), MgCl₂, Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y Buffer. Un programa específico en PCR para la obtención de productos de amplificación y la visualización de dichos productos en un gel de agarosa al 2.5% (30).

3.- Análisis estadístico: Se usará una ANOVA agrupando por variables polimórficas (homocigotos y heterocigotos) de cada gen (5HTTLPR y DRD4); y su relación con el grado de dependencia a la nicotina. Para el análisis de la estadística se utilizará el paquete Statistica de StatSof. versión 11.0. El valor de *p* que se aceptará como significativo será de 0.05.

RESULTADOS.

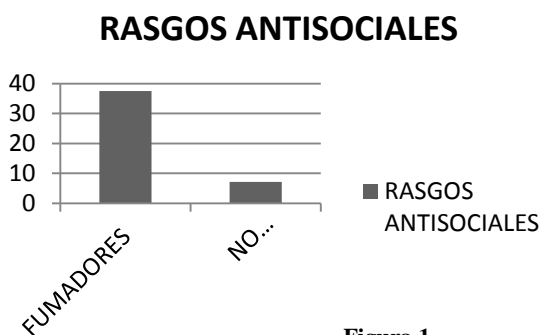


Figura 1

soltero, el 25.8% casado y el resto en unión libre; el 45.1% son estudiantes actuales de algún área de nivel superior, el 19.3% se desempeña como profesionista y el resto se desenvuelve como empleado, técnico u obrero; el 50% reporta no realizar ninguna actividad deportiva y el porcentaje restante se desempeña en actividades como correr, caminata, asistir al gimnasio o practicar algún juego deportivo; por último el consumo de bebidas alcohólicas semanales promedia 3.2 copas \pm 5.4. La distribución de los polimorfismos y los rasgos de personalidad antisocial se muestran en las gráficas (figuras 1, 2 y 3).

En relación a las medidas antropométricas encontramos que el IMC se encuentra en un 24.8 ± 4.15 , lo cual nos indica que la mayoría de nuestra población entra en el rango de peso "normal", sin embargo el 12.9% de los participantes padecen obesidad. El índice cintura-cadera está en 0.84 ± 0.11 , que es indicador de riesgo para desarrollar obesidad central en la población estudiada, aun así el 29% la padece. Respecto al consumo de macro y micro nutrientes encontramos que el consumo promedio de calorías es de 2865 ± 1472.84 , el de carbohidratos es de 376.22 ± 204.81 el de proteínas 91.12 ± 55.95 y el de lípidos 121.37 ± 80.56 . El resto de los resultados se muestran en la tabla 1.

La población estudiada comprende 30 adultos, de los cuales 16 son fumadores y 14 no fumadores, el 18.17% de los fumadores son de género femenino y el resto masculino, en cuanto a los no fumadores el 64.3% corresponde género femenino, los fumadores consumen en promedio 13.3 cigarros al día, de manera similar tienen en promedio 12.26 años con el hábito tabáquico y la edad de inicio se sitúa entre los 7 y los 39 años manteniendo una media de 18.4 años; el 70.9% de la población se ubica en un nivel educativo superior y el resto se encuentran en nivel básico y medio; respecto al estado civil el 61% está

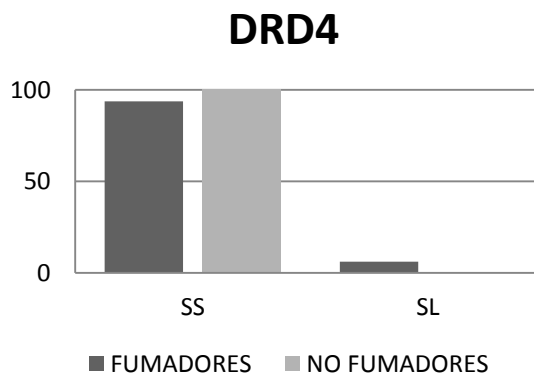
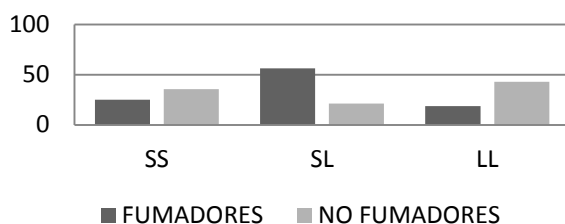


Figura 2

5HTTLPR



Al comparar el grupo de fumadores contra no fumadores no se encontraron diferencias significativas en la evaluación cognitiva y el estrés laboral, con excepción de la percepción de recompensa donde los no fumadores perciben una mayor recompensa $p = 0.03$. Al agrupar en relación a la presencia de rasgos de personalidad antisocial encontramos que aquellos con rasgos de personalidad antisocial tienen una mayor percepción de estrés laboral ($p = 0.006$).

Los resultados del análisis de ANOVA, agrupando por género y fumador o no fumador nos arrojaron que el grupo de hombres no fumadores percibe mayor recompensa que los grupos de mujeres y hombres fumadores ($p = 0.025$ y 0.004 respectivamente). El grupo de mujeres fumadoras presento más estrés laboral que los demás grupos ($p = 0.016$, 0.005 y 0.008). La ejecución del color en la prueba stroop fue más deficiente en los hombres fumadores que en los demás grupos (0.011 , 0.041 y 0.036). Por último el grupo de fumadores hombres presenta más obesidad central que los no fumadores tanto hombres como mujeres.

	Fumadores	No fumadores	t de Studens	
	Media \pm SD	Media \pm SD	df	p
IMC	26.58 \pm 4.19	22.71 \pm 3.06	27.00	0.01
Circunferencia de abdomen	94.36 \pm 10.60	84.69 \pm 7.65	27.00	0.01
Índice cintura-cadera	0.90 \pm 0.09	0.77 \pm 0.10	27.00	0.00

CONCLUSION.

No existen diferencias en las pruebas cognitivas al comparar el grupo de fumadores contra el grupo de no fumadores, sin embargo son los fumadores los que presentan rasgos antisociales; al corregir por género encontramos que los varones fumadores obtienen menor puntaje en la subescala de color de la prueba stroop en comparación de las mujeres y de los varones no fumadores, de la misma manera las mujeres fumadoras perciben mayor estrés laboral en comparación que sus congéneres no fumadoras y los varones fumadores o no, al comparar los grupos los fumadores perciben menos recompensa laboral y son los hombres no fumadores los que perciben mayormente la recompensa laboral. En lo que se refiere a las condiciones antropométricas los fumadores presentan mayor IMC, mayor obesidad visceral y al respecto son los hombres fumadores los que se destacan por esta tendencia. En cuanto a la distribución de los polimorfismos del DRD4 solo una persona presentó el polimorfismo SL por lo que aún no se pueden hacer conclusiones al respecto. En cuanto a la distribución del polimorfismo 5HTTLPR el polimorfismo SL está mayormente presente en el grupo de fumadores, al igual que el polimorfismo LL tal y como lo plantea la literatura previa.

REFERENCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY INC, World Health Organization, and the International Union Against Cancer. (2003). *The Tobacco Control Country Profiles*. 2nd ed. Atlanta:7-12.
- BARR C. S. Newman T.K., Lindell S., Shannon C., Champoux M., Lesch K., Suomi S. J., Goldman D., Higley J. D. (2004). *Interacción between serotonin transporter gene variation and rearing condition in alcohol preference and consumption in female primates*. Arch Gen Psychiatry; 61:1146-1152
- BENNETT AJ, Lesch K-P, Heils A, Long JC, Lorenz JG, Shoaf SE, Champoux M, Suomi SJ, Linnoila MV, Higley JD. (2002). *Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function*. Mol Psychiatry.; 7:118-122.
- CASPI A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H. (2003). *Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene*. Science 301: 386–389.
- ELEY TC, Sugden K, Corsico A, Gregory AM, Sham P, McGuffin P. (2004). *Gene–environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression*. Mol Psychiatry 9: 908–915.
- FROELIGER B, Modlin L, Wang L, Kozink RV, McClemon FJ. (2012). *Nicotine withdrawal modulates frontal brain function during an affective Stroop task*. Psychopharmacology (Berl). Apr;220(4):707-18.
- GERRA G, Garofano L, Zaimovic A, Moi G, Branchi B, Bussandri M, (2005). *Association of the serotonin transporter promoter polymorphism with smoking behavior among adolescents*. Amer J Med Genet, Part B, Neuropsychiatr Genet; 135:73–78.
- GONZÁLEZ CA, Ham-Chande R. (2007). *Funcionalidad y salud: una tipología del envejecimiento en México*. Salud Publica Mex; 49 supl 4:S448-S458.
- GRABE HJ, Lange M, Wolff B, Volzke H, Lucht M, Freyberger HJ, (2005). *Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden*. Mol Psychiatry 10: 220–224.
- HUIJBREGTS S, Seguin J, Zoccolillo M. (2008). *Maternal prenatal smoking, parental antisocial behavior and early childhood physical aggression*. Dev Psychopathol; 20:437–453.453
- JACOBS N, Kenis G, Peeters F, Derom C, Vlietinck R, van Os J (2006). *Stress-related negative affectivity and genetically altered serotonin transporter function: evidence of synergism in shaping risk of depression*. Arch Gen Psych 63: 989–996.
- JOHANSSON A, Ludvigsson J, Hermansson G. (2008). *Adverse health effects related to tobacco smoke exposure in a cohort of three-year-olds*. Acta Paediatr; 97:354–357.
- KAUFMAN J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Crouse-ArtusM, Lipschitz D, Krystal JH. (2006). *Genetic and environmental predictors of early alcohol use*. Biol Psychiatry [E-pub ahead of print].
- KAUFMAN J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Grasso D, Lipschitz D, Houshyar S et al (2006b). *Brain-derived neurotrophic factor- 5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children*. Biol Psychiatry 59: 673–680.
- KAUFMAN J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Houshyar S, Lipschitz D, Krystal JH. (2004). *Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 17316–17321.
- KURI P, Alegre-Díaz J, Mata-Miranda MP. (2002). *Mortalidad atribuible al consumo de tabaco en México*. Salud Publica Mex; 44(supl 1):S29-S33.
- LANGLEY K, Holmans P, Van den Bree M. (2007). *Effects of low birthweight, maternal smoking during pregnancy and social class on the phenotypic manifestations of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and associated antisocial behaviour: investigation in a clinical sample*. BMC Psychiatry; 7:e26.
- LEWIS B, Kirchner H, Short E, (2007). *Prenatal cocaine and tobacco effects on children's language trajectories*. Pediatrics
- LYONS-RUTH K, Holmes BM, Sasvari-Szekely M, Ronai Z, Nemoda Z, Pauls D. (2007). *Serotonin transporter polymorphism and borderline or antisocial traits among low-income young adults*. Psychiatr Genet. Dec;17:339-43
- MCCAFFERY JM, Bleil M, Pogue-Geile ME, Ferrell RE, Manuck SB. (2003). *Allelic variation in the serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cardiovascular reactivity in young adult male and female twins of European-American descent*. Psychosom Med. Sep-Oct;65:721-8
- MUÑOZ-RIVAS, M.J., Raña Gómez, J.L, Peña Fernández, ME.; Andreu Rodríguez, JM. (2002). *Influencia de la conducta antisocial en el consumo de drogas ilegales en población adolescente*. Adicciones, vol.14 núm. 3 • págs. 313/320
- Neuman R, Lobos E, Reich W, (2007). *Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype*. Biol Psychiatry 2007;61:1320–1328.1328
- Perkins K.A., Lerman C, Coddington S., Jetton C., Kerelis J.L., Wilson A., Jennings J.R., Ferrell R., Bergen A.W., and Benowitz N.L. (2008). *Gene and gene by sex associations with initial sensitivity nicotine in nonsmokers*. Behav. Pharmacol.; 19:630-640.
- RIEDEL J, Hapke U, Rumpf HJ, Meyer C, John U. (2002). *Relationship between subjectively perceived working conditions and alcohol consumption: results of the TACOS study*. Gesundheitswesen. Mar;64(3):153-8.
- ROZA S, Verhulst F, Jaddoe V, (2008). *Maternal smoking during pregnancy and child behavior problems: the Generation R study*. Int J Epidemiol. Sep 4;
- TAPIA CONYER R, Kuri Morales P, Meneses González F. (1995). *Smoking attributable mortality-Mexico 1992*. Morb Mortal Wkly Rep; 44:372-381.

- TOVAR-GUZMÁN VJ, Barquera S, López-Antuñano FJ. (2002). *Tendencias de mortalidad por cánceres atribuibles al tabaco en México*. Salud Publica Mex; 44(supl 1):S20-S28.
- URQUIETA JE, Hernández-Avila M, Hernández B. (2006). *El consumo de tabaco y alcohol en jóvenes de zonas urbanas marginadas de México. Un análisis de decisiones relacionadas*. Salud Publica Mex; 48 supl 1:S30-S40
- VILLATORO-VELÁZQUEZ JA, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Téllez-Rojo MM, Mendoza-Alvarado LR, Romero-Martínez M. (2006) *Encuesta nacional de adicciones 2006*.
- VILLATORO-VELÁZQUEZ JA, Medina-Mora ME, Fleiz-Bautista C, Téllez-Rojo MM, Mendoza-Alvarado LR, Romero-Martínez M. (2011) *Encuesta nacional de adicciones 2011*.
- WILHELM K, Mitchell PB, Niven H, Finch A, Wedgwood L, Scimone A. (2006). *Life events, first depression onset and the serotonin transporter gene*. Br J Psychiatry 188: 210–215.
- WONNACOTT S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW. (2000). *Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum*. Eur J Pharmacol; 393:51–8.
- WHO (2006). *Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002–2030: data sources, Methods and results*.
- WHO. (2012). *Tobacco Free Initiative. Why is tobacco a public health priority?*