

María Santamaría González

Estudio de marcadores
genéticos (región NTAD)
asociados con la
dependencia a cocaína.

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense
y Toxicología

Director/es

Sebastián Menao Guillén
Ana Ferrer Dufol

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS
(REGIÓN NTAD) ASOCIADOS CON LA
DEPENDENCIA A COCAÍNA.**

Autor

María Santamaría González

Director/es

Sebastián Menao Guillén
Ana Ferrer Dufol

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2016

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguán <http://zaguán.unizar.es>



Universidad
Zaragoza

Estudio de marcadores genéticos
(región NTAD) asociados con la
dependencia a la cocaína

TESIS DOCTORAL

María Santamaría González

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Facultad de Medicina
2016

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y
Toxicología



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS (REGIÓN NTAD)
ASOCIADOS CON LA DEPENDENCIA A COCAÍNA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Dña. María Santamaría González

Bajo la dirección de los Doctores:

Sebastián Menao Guillén

Ana Ferrer Dufol

Abril de 2016

**SEBASTIÁN MENAO GUILLÉN, PROFESOR ASOCIADO DE
MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

DECLARA:

Que la memoria presentada por Dña. María Santamaría González, con el título “Estudio de marcadores genéticos (región NTAD) asociados con la dependencia a cocaína”, corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al título de Doctor.

Zaragoza, Abril de 2016

Fdo: Sebastián Menao Guillén

**ANA FERRER DUFOL, PROFESORA TITULAR DE MEDICINA
LEGAL Y TOXICOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

DECLARA:

Que la memoria presentada por Dña. María Santamaría González, con el título “Estudio de marcadores genéticos (región NTAD) asociados con la dependencia a cocaína”, corresponde a un trabajo realizado bajo mi dirección. Terminada en esta fecha y revisado su contenido, estimo reúne las condiciones requeridas para optar al título de Doctor.

Zaragoza, Abril de 2016

Fdo: Ana Ferrer Dufol

Esta Tesis Doctoral se ha podido realizar gracias al apoyo económico prestado por la Diputación General de Aragón en forma de:

Reconocimiento de Grupo Consolidado de Investigación de Aragón a “Toximol”, dirigido por D. Víctor Sorribas Alejaldre, durante el periodo comprendido entre los años 2011 y 2013

Reconocimiento de Grupo Consolidado de Investigación de Aragón a “Toximol”, dirigido por D. Víctor Sorribas Alejaldre, durante el año 2014

Se hace camino al andar

A mis padres,
por su esfuerzo y dedicación

AGRADECIMIENTOS

Quiero transmitir mis agradecimientos:

A mis Directores de Tesis, Dr. Sebastián Menao Guillén y Dra. Ana Ferrer Dufol, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por la ayuda prestada durante todos estos años.

A mi tutora, Dra. María Ángeles Sáenz, por estar siempre disponible para lo que he necesitado.

Al profesor Víctor Sorribas por permitirme formar parte del grupo de investigación Toximol.

A todos los profesionales de las Unidades de Atención y Seguimiento de Adicciones que han participado en la selección de los pacientes y a todos los pacientes y voluntarios que aceptaron participar en este estudio haciendo posible esta investigación.

Al Centro Nacional de Genotipado por los estudios genéticos realizados y por recibirme durante mi rotación externa y explicarme todo sobre la metodología utilizada.

Al Dr. Ángel Carracedo por brindarme la oportunidad de ampliar mi formación en genética y perfeccionar mis conocimientos en técnicas de genotipado a gran escala y secuenciación masiva durante mi estancia en la Fundación Galega de Medicina Xenómica.

Al Dr. José A. Cocho por sus valiosos consejos y a todos los profesionales que he conocido en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago por hacer tan agradable y satisfactoria mi estancia.

A mis compañeros de la Comisión de Genética Molecular de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica, por despertar en mí nuevas inquietudes.

A mis compañeros del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, auxiliares, técnicos, enfermeras, residentes y facultativos que forman un gran equipo humano y demuestran constantemente su profesionalidad y competencia, en especial quiero agradecer a Miguel su confianza y disposición durante mi etapa de residencia y después como especialista en el Laboratorio de Bioquímica Clínica.

A mis profesores de la Universidad Complutense de Madrid que me han transmitido su devoción por la ciencia, el significado de la investigación científica y la importancia del trabajo en equipo. En especial agradecer a Charo su amabilidad y confianza a la hora de integrarme como alumna interna en la investigación básica del departamento de Genética.

A mis amigas, Erika e Isabel, por su compañía, por hacerme más amenos los momentos monótonos y por compartir conmigo su experiencia.

A toda mi familia, por el cariño y confianza que siempre han depositado en mí.

A mi hermano, mi otra mitad, por toda la ayuda prestada durante la maquetación, por su infinita generosidad y por estar siempre a mi lado cuando lo necesito.

A mis padres, a los que quiero y admiro, gracias por enseñarme el significado del esfuerzo, la constancia y la determinación, por transmitirme cada día la energía y el apoyo necesarios para avanzar en mis proyectos, pero sobre todo gracias por vuestro amor incondicional.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| °C | Grados Celsius |
| μ | Micra |
| μL | Microlitros |
| μM | Micromolar |
| χ² | Prueba estadística de Chi-cuadrado |
| A | Adenina |
| A₂₃₀ | Absorbancia a 230 nm |
| A₂₆₀ | Absorbancia a 260 nm |
| A₂₈₀ | Absorbancia a 280 nm |
| AC | Adriamicina, ciclofosfamida |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido Desoxirribonucleico complementario |
| AIC | Criterio de Información de Akaike |
| AMPc | Adenosin monofosfato cíclico |
| ANKK1 | Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 |
| APA | Asociación Psiquiátrica Americana |
| ARM | Dominio con repeticiones armadillo |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNm | Ácido Ribonucleico mensajero |
| ARNnp | Ácido Ribonucleico pequeño nuclear |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| ATV | Área tegmental ventral |
| BCP | Normas de Buena práctica clínica |
| C | Citosina |
| cAMP | |
| CEICA | Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón |
| CI | Intervalo de confianza |
| COGA | Collaborative Study on the Genetic of Alcoholism |
| CREB | Factor de transcripción de respuesta a AMPc |
| D | Grado de desequilibrio de ligamiento |
| D1 | Receptor D ₁ de dopamine |
| D2 | Receptor D ₂ de dopamina |
| D2L | Variante larga del receptor D ₂ de dopamina |
| D2S | Variante corta del receptor D ₂ de dopamina |
| D3 | Receptor D ₃ de dopamina |
| D4 | Receptor D ₄ de dopamina |
| D5 | Receptor D ₅ de dopamine |
| dNTPs | Deoxinucleótidos trifosfato |
| dNTPs | Dinucleótidos Trifosfato |
| DRD2 | Gen que codifica para el receptor D ₂ de dopamina |
| DSM | Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales |

| | |
|----------------------|---|
| EDADES | Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España |
| E_i | Frecuencias esperadas |
| EM | Algoritmo Esperanza-Maximización |
| EMCDDA | European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction |
| ESE | Secuencia exónica potenciadora del procesamiento |
| ESS | Secuencia exónica silenciador del procesamiento |
| ESTUDES | Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias |
| EXT | Reacción de extensión de una única base |
| F | Secuencia 5´- 3´ |
| G | Guanina |
| g | Gramos |
| GABA | Ácido gamma-aminobutírico |
| gl | Grados de libertad |
| GWAS | Estudios de asociación genómica |
| HapMap | Mapa o catálogo de Haplotipos del genoma humano |
| HIAA | Ácido 5-hidroxiindolacético |
| hnRNP | Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| ISE | Secuencia intrónica potenciadora del procesamiento |
| ISS | Secuencia intrónica silenciadora del procesamiento |
| ln | Logaritmo neperiano |
| LOD | Logaritmo de probabilidades de que dos genes se encuentren ligados |
| log | Logaritmo decimal |
| LR | Razón de verosimilitudes |
| m | masa |
| MDMA | 3-4 metilendioximetamfetamina o éxtasis |
| mg | Miligramos |
| MHPG | 3-metoxi-4 hidroxifenetilenglicol |
| miARN | Micro- ácido ribonucleico |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mV | Milivoltios |
| NAc | Núcleo accumbens |
| NCAM1 | Gen que codifica para la proteína NCAM1 |
| NCBI | Centro Nacional americano para la Información Biotecnológica |
| NF-kB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa |
| ng | Nanogramos |
| NIDA | Instituto Nacional de Drogas de Abuso de los Estados Unidos |
| nm | Nanómetros |
| NTAD | NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 |
| OAD | Observatorio Aragón de Drogodependencias |
| OED | Observatorio Español de Drogas |
| O_i | Frecuencias observadas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OR | Odds ratio |
| PARP-1 | poli (ADP- ribosilación) de la polimerasa-1 |

| | |
|--------------|--|
| pb | Pares de bases |
| PBS | Tampón fosfato-salino |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PCR-F | Secuencia de oligonucleótidos iniciadores de PCR sentido 5'-3' |
| PCR-R | Secuencia de oligonucleótidos iniciadores de PCR sentido 3'-5' |
| Kb | Kilobases |
| r | Coefficiente de correlación |
| R | Secuencia 3'-5' |
| RFLP | Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción |
| SAP | Fosfatasa Alcalina de camarón |
| SET | Sociedad Española de Toxicomanías |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Polimorfismos de un solo nucleótido |
| SR | Proteínas ricas en Serina y Arginina |
| T | Timina |
| TaqI | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tampón Tris, Borato, EDTA |
| TM1 | Dominio Transmembrana 1 |
| TM7 | Dominio Transmembrana 2 |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| TPARM | Proteína con repeticiones Tetratricopéptido |
| TPR | Tetratricopéptido |
| TTC12 | Gen que codifica para la proteína TPARM |
| UASA | Unidades de Atención y Prevención de las Adicciones |
| UV | Ultravioleta |
| VTA | Area tegmental ventral REPETIDA |
| z | carga |

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1.1. EVOLUCIÓN DE LA DROGODEPENDENCIA EN ESPAÑA..... | 29 |
| 1.2. LA COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO | 34 |
| 1.2.1. Toxicocinética..... | 36 |
| 1.2.2. Toxicodinámica y mecanismo de acción | 39 |
| 1.2.3. Intoxicación aguda..... | 42 |
| 1.2.4. Síndrome de dependencia y abstinencia | 44 |
| 1.2.5. Tratamiento | 46 |
| 1.3. NEUROBIOLOGÍA DE LAS ADICCIONES | 48 |
| 1.4. GENÉTICA DE LA DROGODEPENDENCIA | 53 |
| 1.4.1. Gen <i>DRD2</i> | 54 |
| 1.4.2. Genes contiguos a <i>DRD2</i> : <i>ANKK1-TTC12-NCAM1</i> (Región NTAD)..... | 56 |
| 1.4.3. Otras alternativas de variación genética. | 58 |
| 1.5. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y SUS LIMITACIONES..... | 60 |

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

| | |
|----------------------------------|----|
| 2.1. HIPOTESIS Y OBJETIVOS | 67 |
|----------------------------------|----|

3. PACIENTES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO | 71 |
| 3.2. SUJETOS A ESTUDIO | 71 |
| 3.2.1. Reclutamiento de pacientes | 71 |
| 3.2.2. Controles poblacionales..... | 72 |
| 3.2.3. Consentimiento informado | 73 |
| 3.2.4. Limitaciones | 73 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.3. | MÉTODOS ANALÍTICOS | 73 |
| 3.3.1. | Extracción y cuantificación del ADN..... | 74 |
| 3.3.2. | Procedimiento para el genotipado del polimorfismo TaqIA | 74 |
| 3.3.3. | Genotipado de los SNP vinculados a la región NTAD..... | 78 |
| 3.4. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 85 |
| 3.4.1. | Análisis descriptivo de un polimorfismo | 86 |
| 3.4.2. | Análisis de asociación..... | 86 |
| 3.5. | ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE MÚLTIPLES SNP..... | 89 |
| 3.6. | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS..... | 91 |
| 3.6.1. | Análisis posible patogenicidad de las mutaciones | 91 |
| 3.6.2. | Análisis de sitios ESE | 93 |

4. RESULTADOS

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.1. | ANÁLISIS DESCRIPTIVO. DISTRIBUCIÓN POR EDAD Y SEXO | 99 |
| 4.2. | ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL POLIMORFISMO RS1800497 (TAQIA)..... | 102 |
| 4.2.1. | Genotipado en gel de agarosa tras PCR y escisión enzimática | 103 |
| 4.2.2. | Descripción estadística del polimorfismo..... | 103 |
| 4.3. | ESTUDIO DE SNP EN LA REGIÓN NTAD | 106 |
| 4.3.1. | Genotipado de marcadores por espectrometría de masas | 106 |
| 4.3.2. | Descripción estadística de los polimorfismos..... | 109 |
| 4.4. | ANÁLISIS COMBINADO DE SNP: HAPLOTIPOS..... | 116 |
| 4.4.1. | Desequilibrio de ligamiento entre SNP..... | 116 |
| 4.4.2. | Estimación de las frecuencias haplotípicas..... | 118 |
| 4.4.3. | Análisis de asociación..... | 118 |
| 4.5. | ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN POR SEXOS | 120 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.6. | ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN EN CONSUMIDORES PRIMARIOS DE COCAÍNA | 123 |
| 4.7. | ANÁLISIS IN SILICO DE LOS POLIMORFISMOS | 124 |
| 4.7.1. | Predicción del efecto sobre la proteína | 124 |
| 4.7.2. | Predicción sobre el procesamiento del ARNm | 125 |

5. DISCUSIÓN

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.1. | CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE PACIENTES INCLUIDOS A ESTUDIO | 134 |
| 5.2. | ESTUDIOS GENÉTICOS DIRIGIDOS A LA IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA HACIA LA COCAÍNA..... | 136 |
| 5.3. | POLIMORFISMOS CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA | 139 |
| 5.3.1. | Relación con el gen <i>ANKK1</i> | 142 |
| 5.3.2. | Relación con el gen <i>TTC12</i> | 142 |
| 5.4. | POLIMORFISMOS SIN SIGNIFICACIÓN INDIVIDUAL | 143 |
| 5.5. | RELACIÓN DE CONSUMO DE COCAÍNA CON LA REGIÓN NTAD..... | 144 |

6. CONCLUSIONES

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EVOLUCIÓN DE LA DROGODEPENDENCIA EN ESPAÑA

Con el nombre de droga se designa en sentido genérico a toda sustancia que, introducida en un organismo vivo, pueda llegar a modular los procesos fisiológicos y bioquímicos del mismo (OMS, 2008). En este concepto se incluyen las sustancias estupefacientes y psicotrópicas cuyo consumo continuado desencadena en el organismo una adaptación física u orgánica responsable del deseo compulsivo hacia la misma, aumentando progresivamente la dosis a fin de obtener los mismos efectos y evitar el síndrome de abstinencia (García Jiménez, 2001).

Desde finales del siglo XIX hasta la segunda mitad del siglo XX, las drogodependencias se enfocan clínicamente dentro del área de la salud mental. A finales del siglo XX, la sociedad española comienza a tomar conciencia del problema sanitario y social que supone entre la población juvenil y se empieza a considerar la drogodependencia como una enfermedad que requiere de un enfoque específico. Como consecuencia, surgen las primeras actividades preventivas y asistenciales frente a los problemas relacionados con el consumo de sustancias adictivas (Torres y cols., 2009).

La comprensión institucional sobre la relevancia de las complicaciones derivadas del consumo de drogas constituye un punto de inflexión en la política nacional hasta que en el año 1985 es aprobado en Consejo de Ministros, el Plan Nacional sobre Drogas, iniciándose paralelamente los diferentes Planes Autonómicos. El desarrollo del Plan Nacional sobre drogas, como órgano de coordinación y encuentro entre las administraciones para dotar de un enfoque homogéneo al fenómeno de las drogodependencias, ha facilitado a lo largo de los últimos años la adecuación de las respuestas institucionales a las realidades cambiantes de los consumos, y los problemas y patologías que de ellos se derivan (Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009).

Desde la constitución de los ayuntamientos democráticos, el Ayuntamiento de Zaragoza ha impulsado diversas acciones orientadas a la asistencia y prevención de conductas adictivas. En 1986 se crea el Centro de Atención a las Drogodependencias, antecesor de la actual Unidad de Atención y Prevención de las Adicciones (UASA). A partir de ese momento, desde las diferentes delegaciones y áreas municipales se han ido promoviendo iniciativas, dirigidas a combatir los efectos individuales, familiares y sociales derivados del consumo abusivo de sustancias.

Paralelamente, se ha fomentado la creación de centros sociolaborales destinados a promover la inserción social de las personas una vez superada la adicción (*OAD, 2010-2016*).

Actualmente, la drogodependencia está considerada como un trastorno cerebral crónico que contribuye de forma significativa a la carga mundial de morbilidad (*Asociación Psiquiátrica Americana, 2014*). Constituye un problema de salud pública muy importante (*McCreary y cols., 2015*) y por tanto, resulta interesante recoger información sobre las drogas y sus formas de consumo para realizar un correcto análisis de la situación actual. Por ello, se han creado entidades públicas nacionales e internacionales con el objetivo de evaluar estos datos y fomentar programas de prevención, asistencia y reinserción en el ámbito de las conductas adictivas.

En el marco Europeo, la recopilación de información sobre drogodependencias se realiza bajo procedimientos armonizados, promovidos por la agencia *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA). Según el último informe del 2015, se estima que casi una cuarta parte de la población adulta de la Unión Europea, más de 80 millones de personas, han probado drogas ilegales en algún momento de su vida, siendo el cannabis (75,1 millones) la consumida con más frecuencia. La cocaína, con un menor número de consumidores (14,9 millones) representa el estimulante ilegal más consumido en Europa, si bien su consumo se concentra en un número restringido de países y prevalece en el sur y el oeste del continente europeo. Las anfetaminas (11,7 millones) y el MDMA (11,5 millones) se suman a las drogas de mayor consumo en Europa. Al analizar los hábitos de consumo en la población europea entre 15 y 64 años, aproximadamente el 5% reconoce haber probado cocaína en algún momento de su vida y menos de un 1% lo ha hecho recientemente. Sin embargo, existen claras diferencias entre países, siendo España y Reino Unido los que acumulan un mayor número de consumidores con una prevalencia superior al 2%. Este problema se acentúa entre los jóvenes con edades comprendidas entre los 15 y 34 años, indicando que aproximadamente el 7% de los jóvenes europeos ha probado la cocaína en algún momento de su vida, mientras que el 2% reconoce que el consumo ha sido reciente (*EMCDDA, 2015*).

Paralelamente, se refleja un aumento en el número de europeos que solicita tratamiento especializado para problemas relacionados con el consumo de esta droga. La cocaína es la tercera droga ilegal más común notificada en los centros de tratamiento especializado, después de los opioides y el cannabis (*EMCDDA, 2015*).

Establecer una valoración sobre la mortalidad asociada a la cocaína resulta complicado, en parte porque puede estar enmascarada por otras causas como problemas cardiovasculares. No obstante, en 2013 se notificaron más de 800 muertes asociadas al consumo de cocaína, la mayoría de ellas por sobredosis (*EMCDDA, 2015*).

En España, la evaluación de las conductas adictivas a escala poblacional se realiza a través de un conjunto variado de sistemas de información e investigaciones que aportan datos sobre multitud de indicadores relacionados con las drogas y las drogodependencias (*Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009*). Como principales fuentes de información destacan dos Encuestas Nacionales realizadas en años alternos a cargo de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas: la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES), enfocada a estudiar los comportamientos adictivos en la población española incluida en el rango de edad de 15 a 64 años; y la Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias (ESTUDES), encaminada a valorar los usos de las distintas drogas en jóvenes de 14 a 18 años.

La última encuesta ESTUDES realizada en el año 2014 complementa la información aportada en las ediciones anteriores y proporciona una visión renovada de la situación actual. De ella se concluye que las drogas más consumidas entre los jóvenes españoles son el alcohol, el tabaco y el cannabis; y les siguen los hipnosedantes, la cocaína y el éxtasis, siendo cada vez más frecuente el consumo simultáneo de varias drogas en el contexto de ocio nocturno. La edad media de inicio en el consumo de drogas se sitúa entre los 13 y los 16 años, dependiendo del tipo de droga, siendo la cocaína una de las que predomina en edades más avanzadas (*OED, 2014*).

La encuesta EDADES constata que entre las sustancias psicoactivas ilegales, la cocaína es, después del cannabis, la de mayor prevalencia de consumo en España y que el hábito está más extendido entre personas de 15 a 34 años, siendo la edad media de inicio los 21 años. El consumo experimental de cocaína experimenta una tendencia ascendente en los últimos 10 años, alcanzando su nivel máximo en el año 2013 (10,2%). La prevalencia de consumo difiere entre sexos para todas las sustancias psicoativas, destacando la cocaína como la que más diferencias registra, ya que el consumo en hombres cuadruplica al de las mujeres. (*OED, 2013*).

La reciente Estrategia Nacional sobre drogas 2013-2016 destaca los cambios que se están generando en el perfil de consumo. La combinación de sustancias (alcohol, tabaco, cannabis, cocaína y otros estimulantes) cada vez es más frecuente, se observa un descenso en la edad de inicio y una relación, cada vez más estrecha, con los espacios y tiempos de ocio. También, la aparición de nuevas sustancias, el incremento de trastornos mentales asociados al consumo de sustancias psicoactivas o los nuevos contextos sociales y culturales relacionados con el impacto de la inmigración en España, han tenido su reflejo en el desarrollo del fenómeno de las drogodependencias en los últimos años. A su vez, la mortalidad relacionada con la intoxicación aguda por sustancias psicoactivas ha disminuido durante los últimos años, habiéndose incrementado la proporción de fallecidos por cocaína.

El Observatorio aragonés de drogodependencias (OAD) informa en el II Plan Autonómico que el consumo de sustancias estupefacientes, ha seguido en la Comunidad Autónoma de Aragón, una evolución muy similar a la del resto de España. En el caso concreto de la cocaína, su consumo presenta un crecimiento constante desde principios de los años 90, alcanzando un máximo en el año 2004, momento a partir del cual se observa una tendencia descendente hasta igualarse con las cifras registradas en España en el año 2012 (Figura 1). En ese mismo año, el consumo experimental de cocaína entre los jóvenes aragoneses de 14 a 18 años se sitúa en el 5%, mientras que el 3,7% la habrían consumido en el último año y el 1,7% en los últimos treinta días; siendo de selección prioritaria la administración por vía respiratoria. El porcentaje registrado es siempre superior en los chicos con respecto a las chicas, y si tenemos en cuenta el nivel educativo, predomina entre los que realizan ciclos formativos con respecto a los que cursan enseñanza superior obligatoria o bachillerato. La percepción del riesgo para la salud entre los más jóvenes ha ido aumentando a lo largo de los últimos años, actualmente cerca del 98% perciben un riesgo importante ante el consumo frecuente de cocaína (*OAD, 2010 – 2016*).

Actualmente, la cocaína ocupa el tercer puesto en admisión a tratamiento especializado en Aragón, tras haber sido desplazada por el cannabis en el año 2012 y después del alcohol que sigue siendo la sustancia por la que se inician más tratamientos. Sin embargo, la cocaína ocupa la primera posición entre los pacientes de 21 a 30 años. El incremento observado en el número de tratamientos iniciados por esta sustancia entre los años 2003 y 2004 se estabiliza en años posteriores, hasta que se observa un descenso considerable en el año 2012 (Figura 2), en correspondencia con el descenso de prevalencia de consumo, alcanzando los valores más bajos en Zaragoza y Huesca muy por debajo de los tratamientos iniciados en Teruel (*OAD, 2005-2008*).

En lo referente al número de urgencias por consumo de sustancias psicoactivas registradas en servicios hospitalarios de atención continuada, se constata un descenso progresivo de la cocaína como sustancia presente en los episodios de urgencias, coincidiendo con la tendencia descendente de inicios de tratamiento en centros especializados. Entre los años 2005 y 2007 fue la segunda sustancia mencionada en las historias clínicas tras hipnóticos y sedantes, a partir de ese momento comienza su descenso hasta el último dato registrado en el año 2013 con un porcentaje del 11% (OAD, 2005-2008).

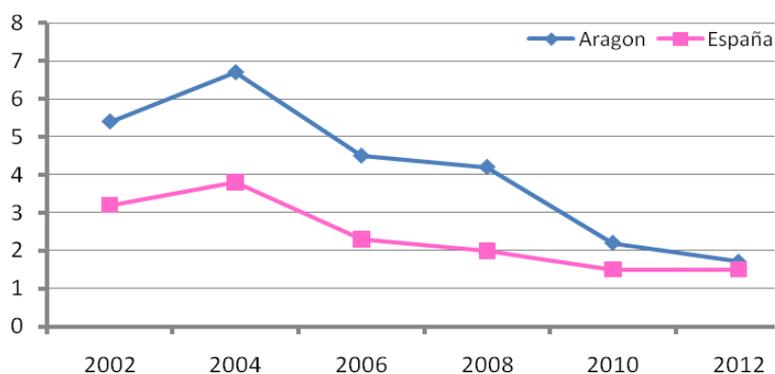


Figura 1. Porcentaje de consumo de cocaína durante el último mes. Población escolarizada entre 14 y 18 años. Aragón y España 2002-2012

Fuente: Encuesta sobre uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias – ESTUDES 2002-2012.
Observatorio Español sobre Drogas

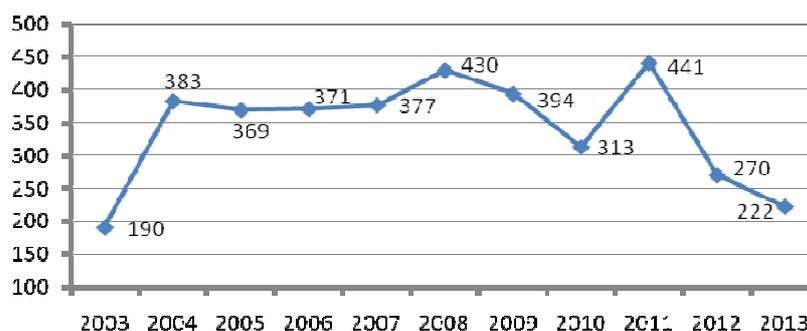


Figura 2. Admisión a tratamiento por consumo de cocaína. Aragón 2003-2013

Fuente: Observatorio Aragonés de Drogodependencias

1.2. LA COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO

La cocaína o benzoilmetilecgonina es un alcaloide cristalino ($C_{17}H_{21}NO_4$), químicamente es un éster del ácido benzoico y una base nitrogenada relacionada con la tropina., la ecgonina (White y Lambe, 2003). Se extrae de las hojas de dos especies de arbustos de la familia de las Eritroxiláceas: *Erythroxylon coca* y *Erythroxylon novogratense*. Se cultivan distintas variedades, principalmente en países del Sur de América (Casale y cols., 2014).

Son plantas arbustivas tropicales originarias de los Andes, perennifolias, fanerógamas, de tamaño pequeño, con tallos leñosos y muy ramificados. Sus hojas de color verde intenso constituyen el componente activo de la planta (Docimo y cols., 2013). Son simples, alternas, elipsoidales, de forma entera, lisas y provistas de estípulas (Figura 3). La epidermis superior está formada por una capa de células con paredes cutinizadas que le dan un aspecto brillante. Debajo de ésta se sitúa el tejido parenquimatoso de donde se extrae el principio activo (León, 2000).



Figura 3. Detalle del arbusto de *Erythroxylon coca*. A. Flor B. Fruto C. Hoja y Flor
Cortesía de H. Zell en Wikimedia Commons. CC BY-SA 3.0

Las flores pequeñas y de simetría radial se disponen en fascículos terminales y axilares (Fig.3.A), tienen cinco sépalos unidos formando un cáliz cónico sobre el que reposan los cinco pétalos libres y blancos, éstos últimos con apéndices liguliformes en el lado interno. Poseen 10 estambres de diferente longitud y unidos por la base. El ovario tiene de tres a cuatro carpelos, de los que sólo se desarrolla uno (*León, 2000*). El fruto (Fig.3.B) es una drupa elipsoidal de pequeño tamaño protegida por un cáliz persistente, cuando alcanza la madurez adquiere un color rojizo y posee una sola semilla que se siembra en viveros hasta que alcanza un tamaño suficiente para ser transplantada, pasados dos años tras la plantación comienza la recolección de sus hojas y puede realizarse hasta 3 o 4 veces al año durante los siguientes 30 años (*García Jiménez, 2001*).

Las propiedades medicinales y energéticas de estas plantas se conocen desde la antigüedad (*Moreno y cols., 2008*) y sus hojas han sido aprovechadas para aliviar la fatiga física, el dolor de cabeza y las molestias gastro-intestinales de cualquier tipo (*Barreto, 2013*). Se refiere su uso para tratar los problemas estomacales, así como el estreñimiento y también la diarrea (*Segura y Martín, 2008*). Sin embargo, desde que se consiguió aislar su principio activo a finales del siglo XIX, surgieron otras formas de consumo con un mayor potencial nocivo (*Bataller, 2004*).

La producción de cocaína ilícita a partir de la planta incluye una primera fase de extracción, en la que se separa del resto de los alcaloides y cristaliza en una sal hasta obtener pasta de coca bruta, y una segunda fase de purificación hasta conseguir clorhidrato de cocaína que adquiere su presentación definitiva como polvo blanco, cristalino e inodoro y definida como la forma de consumo más extendida (*Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, 2012*). No obstante, dependiendo del tratamiento químico que se utilice, el producto final puede distribuirse como hidrocloreuro, clorhidrato o hidrocloreuro (*Segura y Martín, 2008*).

1.2.1. Toxicocinética

Existen diferentes formas de presentación de la cocaína que dan lugar a diferentes formas de consumo y condicionan la toxicocinética, la toxicidad y el grado de adicción de la droga (*Manetti y cols., 2014*). La más extendida es la cocaína aspirada o esnifada y absorbida a través de la mucosa nasal, pero también existen otras formas de consumo, como puede ser la inhalación (fumando la cocaína base), inyección intravenosa o ingestión (SET, 2006).

La cantidad relativa de cocaína que se absorbe a nivel sistémico depende de la vía de administración (Tabla1) y de la cantidad empleada (*Verebey y Gold, 1998; Segura y Martín, 2008*):

- **Las hojas de coca** han sido clasificadas de acuerdo al lugar de procedencia y al sabor o gusto que ofrecen. Contienen del 1 al 3% de cocaína y pueden consumirse masticadas o preparadas en infusión (*Lizasoain y cols., 2002*). La concentración máxima de cocaína en la sangre se alcanza unos 60 minutos después de ingerirla (*Jufer y col., 1998*).
- **La pasta base** se obtiene tras la extracción del alcaloide de las hojas de coca mediante el empleo de sustancias alcalinas, ácido sulfúrico e hidrocarburos. Se presenta en forma de sulfato de cocaína que contiene el alcaloide en un porcentaje variable e impurezas derivadas del proceso de elaboración (*Lizasoain y cols., 2002*). Se consume fumada en cigarrillos, mezclada habitualmente con tabaco (*Castaño, 2000*).
- **El clorhidrato de cocaína**, se obtiene tratando la pasta base con ácido clorhídrico y extrayendo la sustancia con acetona y alcohol etílico, alcanzando una pureza que oscila entre el 25 y 75% (*Bataller, 2004*). Según este grado de pureza, una dosis contiene entre 10 y 35 mg de la droga. La vía de administración más frecuente es la aspiración nasal, por tanto la absorción se produce en la vía respiratoria. No obstante, la cocaína también puede administrarse sobre las mucosas oral o genital. En ocasiones, el clorhidrato de cocaína diluido puede administrarse vía intravenosa, con este método se alcanza una concentración máxima en sangre a los 3-5 minutos después de inyectarla, aunque según los autores puede tardar hasta 8 minutos (*Halpern y cols., 2003*).

- **Cocaína base o crack.** Son dos formas químicamente iguales que proceden del clorhidrato de cocaína y difieren en el proceso de elaboración. La primera tras añadir éter y aplicarle a la mezcla abundante calor. La segunda se obtiene a partir de una solución acuosa que se trata con hidróxido amónico y calor moderado, posteriormente la adición de bicarbonato sódico provoca la precipitación del alcaloide (*Bataller, 2004*). Se inhalan los productos de la combustión del hidrocloreuro de cocaína o de la cocaína base que contiene un porcentaje del 50-95% del alcaloide de cocaína (*Segura y Martín, 2008*).

| Presentación | Concentración | Consumo | Absorción | Inicio | Máxima | Duración |
|------------------------|---------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|
| Hojas coca | 0.5 – 1.5 % | Mascada | 20-30% | 30-60 min | 60 min. | 30-60 min. |
| Pasta Base | 40 – 85% | Fumada | 70-80% | 3-5 seg. | 1-3 min. | 5-15 min. |
| Clorhidrato de cocaína | 12 – 75% | Intravenosa | 100% | 10-60 seg. | 3-5 min. | 10-20 min. |
| | | Intranasal | 20-30% | 1-5 min. | 15-30 min. | 60-90 min. |
| Cocaína base | 30 – 85% | Fumada | 70-80% | 3-5 seg | 1-3 min. | 5-15 min. |

Tabla 1. Formas de presentación de la cocaína.

La cocaína es una base débil con un pka de 8.6, característica que le permite atravesar las membranas celulares rápidamente. La absorción a través de la mucosa nasal o del tracto digestivo es similar pero mucho más lenta que si es inhalada o inyectada (*Lizasoain, y cols., 2002*). La cocaína inhalada pasa inmediatamente a la sangre, tan rápido como tras la administración intravenosa, porque la mayoría de ella llega a los pulmones en las primeras cuatro inhalaciones y es ampliamente distribuida por todo el organismo (*Caballero, 2005*).

Los efectos centrales son casi inmediatos en caso de que la cocaína sea inhalada porque atraviesa la barrera hematoencefálica rápidamente. Las concentraciones plasmáticas máximas son muy variables y dependen de la dosis administrada y de la frecuencia de las mismas (*Lizasoain, y cols., 2002*). El pico plasmático se produce normalmente a los 30 minutos después de la administración nasal (*Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007*), aunque la variabilidad individual es muy grande, con intervalos de 30 a 120 minutos. Por el contrario, cuando la cocaína es inhalada los efectos que se producen son mucho más intensos y precoces, pero la cantidad absorbida es menor y por tanto las concentraciones en plasma son también menores (*SET, 2006*).

La cocaína es rápidamente metabolizada mediante una hidrólisis enzimática hepática que produce dos metabolitos en un porcentaje similar, la benzoilecgonina y la metilesterecgonina, posteriormente transformadas en ecgonina. Ninguno de los dos metabolitos posee actividad biológica significativa en humanos (*Nogué, 2010*). También se produce en cantidades menores norcocaína y otros radicales libres potencialmente activos pero que generalmente no representan cantidades farmacológicamente significativas en clínica humana. El uso concomitante con alcohol, potencia y prolonga los efectos de la cocaína porque a nivel hepático se produce la transesterificación a etilencocaína o cocaetileno (*Hou y cols. 2014*) que tiene una vida media en plasma de 2 a 3 veces más larga que la de la cocaína (*Hart y cols., 2000*).

Todos los metabolitos de la cocaína tienden a acumularse en el tejido graso desde el cual se liberan lentamente. La benzoilecgonina se detecta en orina hasta al menos 3-4 días después de un consumo moderado y dependerá de la cantidad de cocaína consumida y del valor de corte que se establezca o de la sensibilidad de la técnica analítica (*SET, 2006*). Por ello, es el metabolito más utilizado para monitorizar los tratamientos de desintoxicación. La benzoilecgonina puede detectarse también en la saliva, el cabello o el sudor, mediante técnicas de enzimoanálisis. Las técnicas cromatográficas son capaces de detectar metabolitos de cocaína hasta 10-20 días después de consumos moderados y se utilizan para confirmar, por motivos medicolegales, los resultados obtenidos con los procedimientos habituales (*Fernández y cols., 2015*).

Sólo un pequeño porcentaje de la droga (1-5%) es excretado por vía renal sin sufrir ningún tipo de transformación, pudiéndose detectar en la orina hasta 48 horas después de la administración. Esta eliminación renal está directamente relacionada con el pH de la orina; cuando éste es francamente ácido, se produce un incremento de la depuración, mientras que en orinas neutras o alcalinas, la eliminación es prácticamente nula (*Lorenzo, 2009*).

1.2.2. Toxicodinámica y mecanismo de acción

En las dos últimas décadas se ha ampliado extraordinariamente el conocimiento de las bases neurobiológicas de la dependencia a cocaína. Desde el punto de vista neurobiológico, la cocaína se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta (*Nogué, 2010*), porque es capaz de imitar las acciones de las catecolaminas, no actuando directamente sobre los receptores adrenérgicos o dopaminérgicos, sino aumentando la disponibilidad de los neurotransmisores en la hendidura sináptica mediante el bloqueo del transportador, lugar de la membrana presináptica encargado de retirar el neurotransmisor liberado por los terminales nerviosos (*Koob, 1999*) e inhibiendo por tanto, los procesos de recaptación tipo I desde la hendidura sináptica al terminal presináptico, tanto a nivel central como periférico.

El bloqueo del transportador produce un aumento de la concentración sináptica de estos neurotransmisores y potencia la transmisión (*Nogué, 2010*), provocando la estimulación persistente del sistema nervioso central (Figura 4). Aumenta la actividad dopaminérgica, particularmente en el área tegmental ventral (ATV) (*Juarez y Han, 2016*) y en el núcleo *accumbens* (*Calipari y col., 2016*); las principales áreas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. También incrementa la actividad glutamatérgica en el núcleo *accumbens*, el ATV, el estriado y la corteza prefrontal (*Kalivas y Duffy, 1998*).

El mecanismo de transmisión dopaminérgica se inicia en el terminal nervioso con la síntesis de dopamina. El neurotransmisor se almacena en vesículas que se fusionan con la membrana presináptica tras recibir el impulso nervioso, liberando la dopamina a la hendidura sináptica (Fig.4.A). Las moléculas de dopamina pueden unirse al receptor de la dopamina localizado en la célula postsináptica o ser recaptadas por el transportador de dopamina (Fig.4.B). Cuando la cocaína está presente, se une a los transportadores de dopamina impidiendo su recaptación (Fig.4.C). Esto se traduce en una elevada concentración de dopamina en la hendidura sináptica con la consiguiente activación de un mayor número de receptores de dopamina (*NIDA, 2007*).

Cuando la dopamina se une a su receptor, otra proteína denominada proteína G se aproxima al receptor de dopamina y activa a la adenilato ciclasa para producir adenosin monofosfato cíclico (AMPC), una molécula que controla muchas funciones importantes en la célula, incluyendo la capacidad de la célula para generar impulsos eléctricos (Fig.4.C).

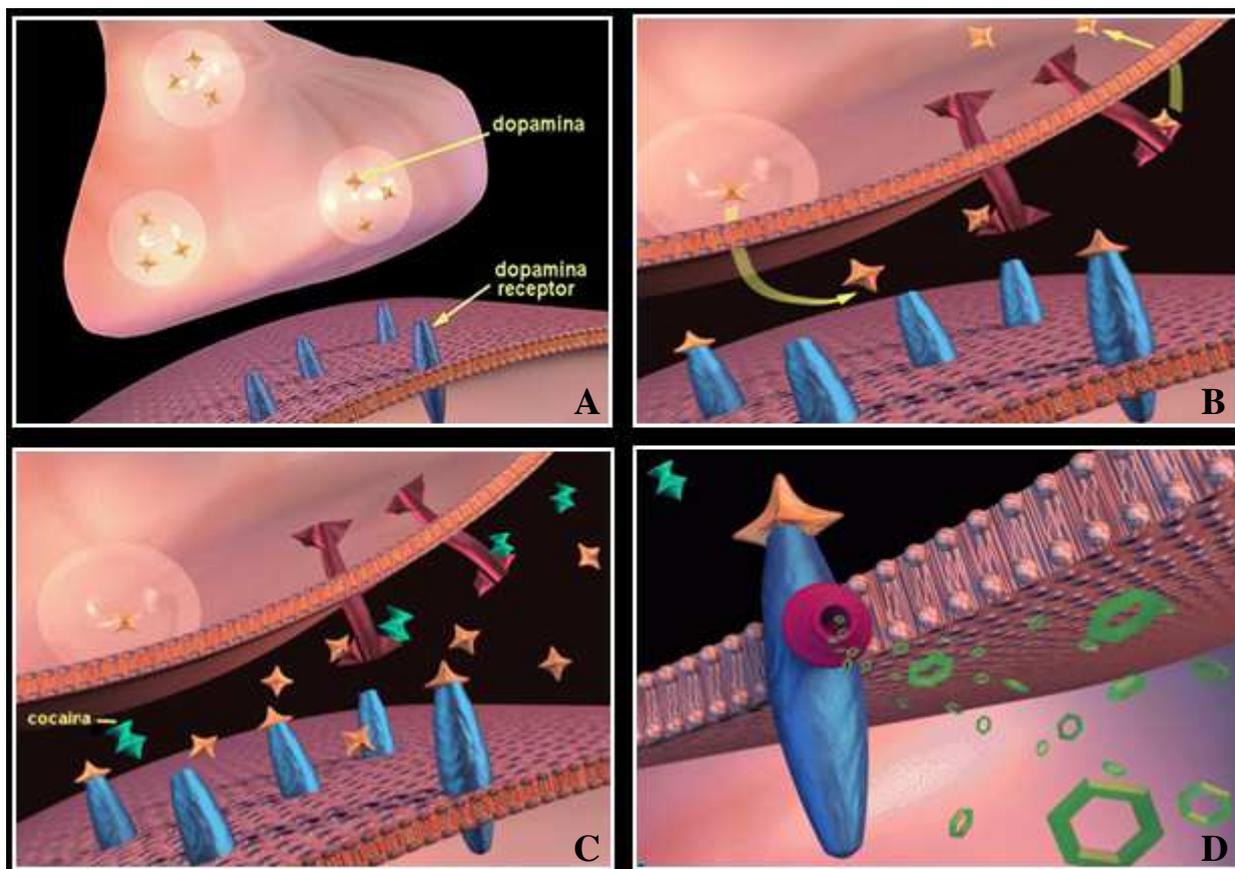


Figura 4. Mecanismo de acción de la cocaína

Fuente: National Institute of Drug Abuse (NIDA), Estados Unidos.

El aumento de la activación de receptores de dopamina como consecuencia del bloqueo de la recaptación por cocaína, provoca un aumento de la producción de AMPc con cambios importantes dentro de la célula post-sináptica que conducen a patrones de disparo anormales (*NIDA, 2007*).

Diferentes estudios han demostrado que las lesiones selectivas de la vía dopaminérgica mesolímbica o el bloqueo de los receptores de dopamina reducen la administración de esta sustancia estimulante por parte de los animales experimentales (*Rocha, 2003*).

La cocaína también bloquea la recaptación de serotonina, y el consumo crónico de esta sustancia provoca una disminución de la biodisponibilidad de este neurotransmisor que se refleja en la disminución de los metabolitos 3-metoxi-4 hidroxifenetilenglicol (MHPG) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (*SET, 2006*).

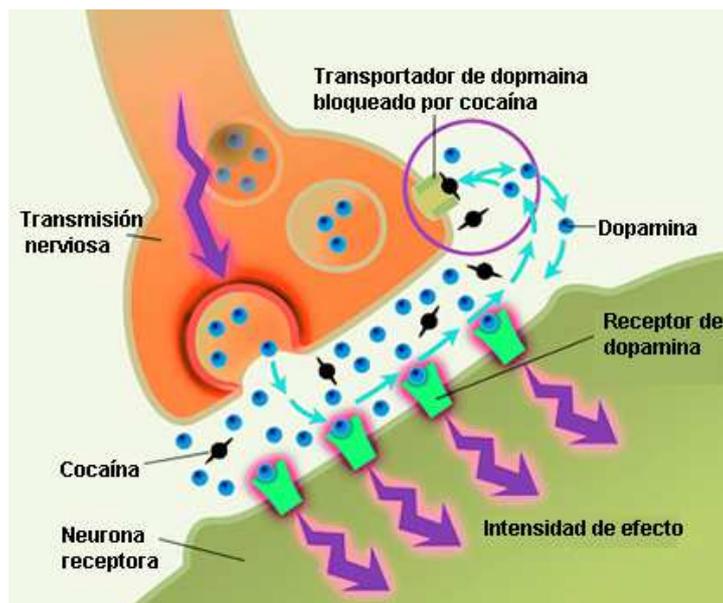


Figura 5. Mecanismo de acción de la cocaína.

Fuente: National Institute of Drug Abuse (NIDA), Estados Unidos.

Los efectos clínicos son consecuencia de las funciones fisiológicas de esta droga a nivel del sistema nervioso central como amina simpaticomimética indirecta de tipo I, tras incremento de los niveles de aminas biógenas en el terminal sináptico (Figura 5); además produce aumento de los aminoácidos excitadores aspartato y glutamato (Platt, 2000; Lizasoain y cols., 2002).

En consecuencia, el exceso de dopamina provoca una potente estimulación del sistema nervioso central. A su vez, las catecolaminas son responsables de un aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, diaforesis, temblor y midriasis y agitación psicomotriz. La cocaína provoca también una intensa vasoconstricción coronaria mediada por receptores α -adrenérgicos, por la disminución del óxido nítrico (vasodilatador) y el aumento de la endotelina 1 (vasoconstrictora) (Nogué, 2010). Por último, el exceso de serotonina produce alucinaciones, psicosis, aumento de la actividad sexual y de la temperatura corporal, aumenta los niveles de las hormonas tiroideas y posee efectos anoréxicos e inhibitorios del sueño por la acción que ejerce sobre el hipotálamo, sistema reticular ascendente y cerebelo (Iglesias y cols., 2009).

A nivel local, la cocaína produce bloqueo de los canales de sodio a través de los nervios sensitivos, interrumpiendo la transmisión y por tanto la sensibilidad. Esta propiedad de bloqueo de la transmisión nerviosa ha permitido utilizarla como anestésico local (Noble, 2015).

1.2.3. Intoxicación aguda

Dosis superiores a 20 mg de cocaína esnifada o tras inyección endovenosa única son potencialmente mortales; si la administración es vía oral, la dosis aproximada se sitúa en 1 gramo (Nogué, 2010). Por ello, ante la sospecha de una posible sobredosis es muy importante ingresar y monitorizar al paciente en los servicios de urgencias, comprobando su evolución y registrando los síntomas que variarán en función del grado de intoxicación que presente el paciente (Dueñas, 1999).

Si la intoxicación es leve se produce una ligera elevación de la tensión arterial así como de la temperatura corporal (Balcells, 2001); además el paciente puede referir cefalea, náuseas y diaforesis (Roncero y cols., 2001); a la exploración clínica puede observarse hiperreflexia, midriasis, palidez, temblor, agitación, ansiedad y euforia. Si se trata de una intoxicación moderada, los síntomas descritos anteriormente se agudizan y al aumento de tensión arterial hay que añadir taquipnea, disnea, taquicardia, trastornos metabólicos, calambres musculares, confusión, alucinaciones táctiles, delirios paranoides, ansiedad extrema, crisis de pánico y en ocasiones convulsiones generalizadas (Torres y Climent, 2006; Rao y Hoffman, 2014). Cuando la intoxicación es severa, supone una urgencia vital que comienza con hipotensión, taqui-bradicardia, arritmias ventriculares, apneas, hipertermia maligna, parálisis flácida, edema agudo de pulmón y cuadro delirante agudo (Zimmerman, 2012.)

Estos efectos son el resultado de la estimulación central y dependen de la dosis y de la vía de administración (Nogué, 2010). La hiperactividad simpática que se desencadena tras la descarga masiva de catecolaminas, condiciona la actividad de múltiples sistemas; pueden producirse situaciones de emergencia hipertensiva y aparecer complicaciones renales, respiratorias, neurológicas o cardiovasculares en las primeras horas posteriores al consumo de cocaína (Burillo-Putze y cols., 2008). La morbilidad cardiovascular incluye isquemia cardiaca, accidentes cerebrovasculares e infarto de miocardio (Lange y Hillis, 2001), siendo ésta última la complicación cardiovascular más frecuente (Weber, 2003). La mayoría de los síndromes coronarios se producen durante las tres horas siguientes al consumo (Balcells, 2001). Los consumidores de cocaína tienen un riesgo siete veces mayor que los no consumidores de tener un infarto cardiaco no mortal (Flores, 2008) y uno de cada cuatro de estos infartos, en personas menores de 45 años se asocia con el consumo de cocaína (Sánchez, 2004).

Los trastornos respiratorios aparecen con frecuencia asociados al consumo de cocaína inhalada, siendo frecuentes el neumotórax, neumomediastino y neumopericardio (*Solano y cols., 2006*). De forma aislada, se han descrito casos de edema pulmonar no cardiogénico (*Kleerup y cols., 2002*). La parada respiratoria central puede aparecer por afectación de los centros medulares que controlan la respiración y que puede desencadenar muerte súbita (*Balcells, 2001; Lizasoain y cols., 2002*). Entre las complicaciones de las vías respiratorias superiores, generalmente secundarias al consumo por vía intranasal destacan la sinusitis, la osteítis, la pérdida del olfato, el sangrado de la nariz, los problemas para tragar, la ronquera y la irritabilidad e inflamación de la mucosa nasal (*Balcells, 2001*). Si el consumo es crónico, frecuentemente se produce una perforación del tabique nasal con sintomatología que incluye crepitación nasal, epistaxis y dolor y posteriormente silbidos por entrada de aire en la inspiración (*Balcells, 2001*).

Además de las complicaciones descritas, pueden asociarse reacciones adversas añadidas por mezclar la cocaína con otras drogas tales como la heroína, las anfetaminas, las benzodiazepinas y el alcohol (*Caballero, 2005; Nogué, 2010*).

No existe tratamiento farmacológico específico para la intoxicación aguda por cocaína, por tanto el tratamiento irá dirigido a paliar los síntomas. En caso de ansiedad o agitación, se administrará diazepam o propranolol. La semivida plasmática de la cocaína es corta y la mayoría de los efectos adversos graves secundarios al consumo de esta droga disminuyen en las primeras horas posteriores a su uso (*Lorenzo, 2009*).

Las manifestaciones clínicas de la intoxicación evolucionan de manera bifásica, presentándose primero una fase de estimulación y luego una de depresión en orden descendente, desde la corteza hasta la médula (*Ochoa, 2000*).

Un caso especial de sobredosis grave y riesgo añadido se produce cuando al portador de cocaína vía gastrointestinal (*body packers*) (*Nogué, 2010*) se le rompen accidentalmente los paquetes cargados de cocaína (*Madrazo y cols., 2007*) y pueden absorberse cantidades letales del alcaloide con un desenlace fatal (*González, 2009*).

1.2.4. Síndrome de dependencia y abstinencia

El manual DSM-5 recoge los criterios suficientes para diagnosticar los trastornos relacionados con sustancias y trastornos aditivos (*Asociación Psiquiátrica Americana, 2014*).

La cocaína es la droga con mayor capacidad de recompensa o refuerzo positivo (*Torres y Climent, 2006*). La corta vida media en el organismo hace que sus efectos euforizantes sean breves y vayan seguidos de un estado disfórico, que intensifica el contraste con la sensación de bienestar que anteriormente ha producido (*García del Castillo y López -Sánchez, 2005*). Todo ello conduce a una pauta de conducta de autoadministración reiterada y frecuente (*Moreno y cols., 2008*).

Existen diversidad de opiniones acerca de si los individuos desarrollan tolerancia a algunos efectos centrales de la cocaína y muchos consumidores refieren que necesitan aumentar la dosis para conseguir los mismos efectos reforzadores. Asimismo, se ha observado, tras la administración de dosis repetitivamente altas de cocaína, un fenómeno de tolerancia aguda a la euforia que se manifiesta por depresión de rebote y deseo intenso de la droga como consecuencia de una disminución cerebral de los niveles de dopamina (*García del Castillo y López -Sánchez, 2005*).

Durante la administración de dosis bajas y repetidas se ha descrito un fenómeno de tolerancia inversa inducida por la depleción cerebral de dopamina y noradrenalina, que redundaría en una disminución funcional de la actividad catecolaminérgica con la aparición de fenómenos de hipersensibilización de los receptores dopaminérgicos postsinápticos (*Llopis, 2001*). En estos casos se producen los mismos efectos pero con dosis menores o administrados intermitentemente.

El consumo crónico se asocia con una serie de cambios sutiles como irritabilidad, hipervigilancia, actividad psicomotora extrema y deterioro de las relaciones interpersonales. Son frecuentes los problemas psiquiátricos, agravados en caso de existir una predisposición psicopatológica (*Ladero y Martín, 1998*). Uno de los más graves, es el trastorno psicótico de tipo paranoide, caracterizado por ideas delirantes persecutorias y acompañado de un comportamiento violento; en estos casos, el tratamiento con neurolépticos debe llevarse a cabo en el ámbito hospitalario (*Weddington y cols., 1990*). También pueden asociarse al consumo prolongado de cocaína los trastornos afectivos generalmente de tipo bipolar, crisis de pánico, ansiedad, trastornos de la alimentación, trastornos del sueño, alucinaciones auditivas y con menos frecuencia cuadros de delirium (*García del Castillo y López -Sánchez, 2005*).

El consumo de cocaína suele seguir un patrón en el que se alternan períodos de uso repetido con otros libres de droga (*Calafat y cols., 2001*). La supresión brusca de la administración de cocaína puede originar una sintomatología que reúne las condiciones fijadas en el DSM-5 para ser considerada como síndrome de abstinencia (*Asociación Psiquiátrica Americana, 2014*). Se presenta a las pocas horas o días después de interrumpir o disminuir el consumo abundante y prolongado de cocaína y se identifica por la presencia de un estado de ánimo disfórico acompañado por varios cambios fisiológicos que inducen un cuadro de malestar clínico significativo con deterioro laboral, social o de otras áreas importantes de la actividad del individuo (*Weddington y col., 1990*). Los síntomas son antagónicos a los que se producen tras el consumo de la droga (*Llopis, 2001*).

La sintomatología descrita durante el síndrome de abstinencia es variable según la fase en la que se encuentre el paciente (*Glawin y Kleber, 1986*).

Fase I o Abatimiento, se relaciona con una sensación de disforia o abatimiento inmediato tras el consumo. Inicialmente se suceden deseos intensos de consumo, anhedonia, insomnio e irritabilidad. Pueden aparecer síntomas depresivos con ideas o comportamiento suicidas, que constituyen el problema más grave observado durante esta fase. Gradualmente remiten las ideas delirantes y son reemplazadas por el deseo de dormir. Es una etapa de hundimiento psíquico, físico y con reducción progresiva del deseo de consumo que puede durar hasta 4 días.

Fase II o Abstinencia, es el periodo de máximo potencial de recaída que persiste entre una y diez semanas. Cursa con anhedonia, cierta disforia, anergia, ansiedad, irritabilidad. El deseo de consumir aumenta especialmente en el contexto de estímulos ambientales. En esta fase es donde el tratamiento farmacológico puede ser más beneficioso.

Fase III o Extinción, de duración ilimitada. A lo largo de esta fase, se recupera el estado afectivo de base con una respuesta hedónica normalizada. El contacto con estímulos condicionantes que desencadenan el consumo puede precipitar la recaída hasta que son definitivamente extinguidos.

1.2.5. Tratamiento

Para tratar la adicción a la cocaína es preferible utilizar una combinación de tratamiento farmacológico y psicológico (*Lacoste y cols., 2012*). El manejo de contingencias o incentivos para conseguir una mayor motivación en la abstinencia y evitar la recaída, así como la terapia cognitivo-comportamental están resultando ser las técnicas psicológicas más eficaces (*Miñarro, 2012*). Se utilizan técnicas de prevención de recaídas como romper contactos con amigos que usan la droga y evitar situaciones que se asocian con el uso de la cocaína y su disponibilidad. También se utilizan técnicas de condicionamiento y extinción para eliminar respuestas condicionadas que pueden ser importantes en la recaída (*Beck, 2000*). Además se deben realizar análisis de orina de una a tres veces a la semana para verificar el cumplimiento del programa (*García-Rodríguez, 2008*).

Este tratamiento se puede realizar en la comunidad, aunque existen ciertos factores como pueden ser la depresión severa, síntomas psicóticos, uso intravenoso, abuso de otras drogas o problemas médicos severos que condicionan hacer el tratamiento en el hospital. Aunque es más fácil controlar el consumo de drogas en un paciente ingresado, el tratamiento ambulatorio tiene la ventaja para el paciente de aprender a enfrentarse al estímulo, favoreciendo que se pueda reafirmar en su postura de abstinencia (*Araos y cols., 2014*).

El tratamiento farmacológico de la dependencia a cocaína está orientado a revertir las alteraciones producidas por la cocaína sobre el sistema dopaminérgico, especialmente la hipersensibilidad de los receptores consecuencia del uso prolongado de la droga y el agotamiento del neurotransmisor, responsables de la disforia, el síndrome de abstinencia y la anhedonia (*García del Castillo y López -Sánchez, 2005*).

Durante los últimos años se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas para compensar los cambios neuroadaptativos asociados con el uso crónico de cocaína y se ha estudiado la posibilidad de utilizar agonistas y antagonistas dopaminérgicos como una opción terapéutica (*Miñarro, 2012*). Se ha demostrado que la administración de antagonistas dopaminérgicos de los receptores D₁ y D₂, en la amígdala, disminuye la recaída provocada por la presentación de estímulos asociados al consumo de cocaína, en modelos animales de adicción (*Ciccocioppo y cols., 2001; Berglind y cols., 2006*).

Como agonistas dopaminérgicos se ha probado la amantadina, bromocriptina, bupropion, metilfenidato, mazindol y como antagonistas el haloperidol, fluopentixol, risperidona y ecopipam. Sin embargo ninguna de estas sustancias ha ofrecido una opción de tratamiento clínicamente eficaz y no existe evidencia científica concluyente para utilizarlas como tratamiento de la adicción a la cocaína (*Soares y cols., 2003*).

Los antidepresivos tricíclicos también han sido estudiados como opción terapéutica, la imipramina y la desimipramina se han utilizado en el tratamiento del síndrome de abstinencia. Con la desimipramina se consigue disminuir los síntomas de la abstinencia y se utiliza como tratamiento de elección en un alto número de pacientes (*McDowell y col., 2005*). No obstante, los antidepresivos en su conjunto no se consideran eficaces en el tratamiento de la dependencia a la cocaína. (*Lima y col., 2003*).

A pesar de los esfuerzos en el desarrollo de nuevos medicamentos, ningún tratamiento ha demostrado tener una actividad y mecanismo de acción suficiente para combatir la adicción a la cocaína (*Kleber, 2003; Haro y cols., 2003*). Se están desarrollando ensayos clínicos con fármacos que promueven la liberación de GABA o la inhibición de la transmisión glutamatérgica (*Kalivas y cols., 2007*), además de otros compuestos como el modafinil (*Kampman y col., 2015*) y el disulfiram que previene la metabolización de la dopamina (*Shorter y Kosten, 2011*). El tratamiento con disulfiram acompañado de terapia cognitivo-conductual demostró ser más eficaz que el placebo y la psicoterapia interpersonal (*Carroll y cols., 2004*).

Desde el punto de vista médico, la falta de terapias eficaces y seguras, ha instigado esfuerzos para desarrollar enfoques alternativos para el tratamiento y actualmente se está trabajando en mejorar la llamada vacuna contra la cocaína que impediría la entrada de esta droga en el cerebro (*Kinsey y cols., 2010*). Esta vacuna ha demostrado un gran potencial para el tratamiento al provocar una respuesta de anticuerpos que bloquea los efectos farmacológicos de la droga (*Kosten y cols., 2014*). La combinación de la vacuna con los niveles alcanzables de una enzima que hidroliza la cocaína a metabolitos inactivos, puede mejorar los resultados del tratamiento, reduciendo sensiblemente el riesgo a las recaídas (*Orson y cols., 2014*).

1.3. NEUROBIOLOGÍA DE LAS ADICCIONES

En el proceso adictivo, uno de los fenómenos más relevantes está relacionado con los efectos reforzantes inducidos por las drogas. De hecho, es condición necesaria que las drogas ejerzan algún tipo de efecto placentero para que se desarrolle y consolide el proceso adictivo (*Calipari y col., 2016*). La adicción comienza como una conducta instrumental cuyo objetivo, la obtención y consumo de la droga, es estimulado por las cualidades hedónicas de la sustancia, con el aumento subsiguiente de la frecuencia de consumo (*Corominas, 2007*).

Diferentes equipos han estudiado los distintos sistemas neuroquímicos que modulan los efectos reforzantes de las drogas de abuso (*Nogué, 2010; Juárez y Han, 2016*). Entre ellos, destaca el sistema dopaminérgico. Este sistema tiene funciones importantes en la regulación del mecanismo de recompensa, control motor y cognición que ejerce a través de su neurotransmisor principal, la dopamina (*Ernst y Luciana, 2015*).

En el Sistema Nervioso existen ocho rutas o vías dopaminérgicas, de las cuales las cuatro más relevantes para entender la fisiopatología de las adicciones son (Figura 6):

- **Vía Mesolímbica:** transmite dopamina desde el área ventral tegmental (ATV) localizada en el mesencéfalo hasta el núcleo *accumbens* en el sistema límbico.
- **Vía Mesocortical:** transmite dopamina desde el ATV hasta la corteza frontal
- **Vía Nigroestriada:** transmite dopamina desde la sustancia negra hasta el cuerpo estriado y es la responsable del control fino de los movimientos
- **Vía Tuberoinfundibular:** transmite la dopamina desde el hipotálamo hasta la glándula hipófisis, donde inhibe la secreción de prolactina.

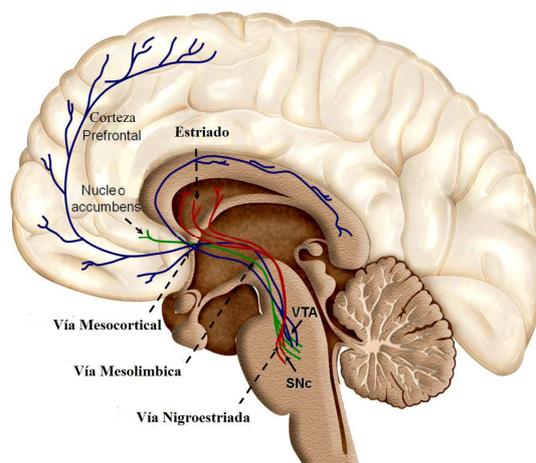


Figura 6. Vías Mesolímbica (verde), Mesocortical (azul) y Nigroestriada (rojo).

Las neuronas dopaminérgicas localizadas en el área tegmental ventral (ATV) y en la sustancia negra (SNc) proyectan sus terminaciones hacia el estriado (núcleo caudado, putamen y núcleo accumbens) y hacia la corteza prefrontal.

Modificada de Arias-Carrión. CC BY 4.0

El control de la función motora está vinculado con la vía nigroestriada (*Puelles y col., 2008*). Pero además, el sistema dopaminérgico regula procesos cognitivos a través de la vía mesocortical y está involucrado en el mecanismo de recompensa cerebral modulando la conducta motivada y los procesos de aprendizaje a través de la vía mesolímbica (*González y Matute, 2013*).

La dopamina es el neurotransmisor clave durante el proceso de aprendizaje, sintetizada en los cuerpos neuronales de las células nerviosas dopaminérgicas localizadas dentro del área tegmental ventral (*Puelles y col., 2008*) que proyectan sus terminaciones a áreas límbicas como el núcleo accumbens y la corteza prefrontal (*Tierney y cols., 2000; Soutullo y Díez, 2007*). A su vez, el sistema dopaminérgico está interconectado con otros sistemas de neurotransmisión como son el glutamatérgico, gabaérgico, opioide y cannabinoide, que en su conjunto constituyen las bases del mecanismo recompensa.

Las sustancias psicoactivas ejercen su acción en lugares concretos a lo largo de este complejo sistema estimulando de forma independiente la descarga de las neuronas dopaminérgicas y modulando los cambios adaptativos necesarios para que se consolide el proceso adictivo (*Nestler y Aghajanian, 1997*). Existe una clara diferencia entre el consumo agudo y el crónico; mientras el primero induce un incremento de los niveles de dopamina extracelular que, en individuos vulnerables puede originar el inicio del proceso adictivo (*Nestler, 2001*), el segundo se acompaña de una disminución de la función dopaminérgica con desarrollo de cambios neuroadaptativos en las vías mesolímbicas y mesocorticales (*Fernández-Espejo, 2002*).

Las diversas funciones fisiológicas de la dopamina están mediadas por su unión a cinco receptores. Estos receptores pertenecen a la familia de GPCRs cuyas estructuras son caracterizadas por la presencia de 7 hélices transmembrana (TM₁-TM₇) (Varady y Shaomeng, 2006). Al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, están organizados topográficamente en 7 segmentos transmembrana relativamente hidrofóbicos, unidos por 3 segmentos extracelulares y 3 intracelulares con un amino terminal inicial externo y un carboxilo terminal intracelular final (Tarazi y cols., 2004). Aunque todos los receptores de dopamina son receptores metabotrópicos, y se encuentran acoplados a una proteína G, se diferencian en el efecto farmacológico que generan tras su unión a la dopamina.

En base a esta diferencia se ha establecido una clasificación en dos grupos (Cavallotti y cols., 2004). La familia o clase de receptores D₁, formada por D₁ y D₅, se acoplan a una proteína G que estimula la enzima adenilciclasa (AC). La familia de receptores D₂ está integrada por D₂, D₃ y D₄ que se acoplan a proteínas G inhibitoras de la AC. La enzima AC cataliza la conversión de adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (AMPc), molécula implicada en la transducción de señales. La activación de los receptores dopaminérgicos altera la funcionalidad de los canales de K⁺ y modifica las concentraciones intracelulares de calcio; todos ellos constituyen factores importantes relacionados con el proceso de aprendizaje y memoria (Neve y cols., 2004).

Los receptores D₁ y D₂ están ampliamente expresados en el SNC (Dziedzicka-Wasylewska y cols., 2006). Los primeros desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la adicción y se han relacionado con la sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, en especial por los psicoestimulantes (Corominas, 2007). Los cambios neuroadaptativos afectan a los receptores D₁, pues se ha descrito una regulación al alza de los receptores D₁ durante los primeros días de abstinencia de cocaína (Alburges y cols., 1993; Unterwald y cols., 2001), alcohol (Djouma y Lawrence, 2002; Lograno y cols., 1993) y opiáceos (May y cols., 1998). Además, se ha asociado un aumento de la respuesta de los receptores D₁ con el consumo crónico de la droga, que persiste un mes después del inicio de la abstinencia (Henry y White, 1995; Henry y cols., 1998). Estos cambios neuronales desempeñan un papel importante en la sensibilización dopaminérgica inducida por el consumo crónico de drogas de abuso (Corominas, 2007).

Los receptores dopaminérgicos D_2 se encuentran en áreas relacionadas con el control del movimiento, principalmente en el estriado (núcleo caudado y putamen) pero también se encuentran en áreas límbicas y han sido ampliamente estudiados en relación con la adicción a sustancias psicoactivas. Existen dos isoformas o variantes del receptor dopaminérgico D_2 que se diferencian en tamaño y función. La variante corta D_{2S} es un autoreceptor y regula la síntesis de dopamina en los cuerpos neuronales presinápticos. La variante larga D_{2L} ejerce su función en la membrana postsináptica (Picetti y cols., 1997). El cociente existente entre las dos isoformas se inclina hacia la isoforma larga. No obstante, se han descrito variaciones en la proporción de las isoformas, asociadas probablemente a variantes genéticas (Usiello y cols., 2000).

Uno de los parámetros más estudiados en la adicción a sustancias es la densidad de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 . Se ha descrito una regulación a la baja de los receptores dopaminérgicos en el estriado de los pacientes en comparación con los controles sanos. La disminución de receptores D_2 se ha observado en pacientes adictos a los psicoestimulantes, como la Anfetamina (Volkow y cols., 2001) y la cocaína (Martínez y cols., 2004), y en la adicción a los opiáceos (Wang y cols., 1997) y al alcohol (Heinz y cols., 2004). Algunos autores han propuesto que la disminución en la expresión de los receptores D_2 en pacientes adictos podría preceder a la adicción y estar presente antes del primer contacto con la droga (Guardia y cols., 2000).

En pacientes dependientes se demostró una disminución de la densidad de D_2 que persiste después de varios meses de abstinencia (Volkow y cols., 1993). A partir de entonces surge la hipótesis de que una disfunción de los receptores D_2 podría predisponer a conductas adictivas como un intento de compensar la sensación básica de malestar (Khantzian, 1985) denominado síndrome de déficit de recompensa (Comings y Blum, 2000). Se ha confirmado una relación entre la reducción de D_2 y la predisposición al consumo de cocaína en estudios realizados con primates (Morgan y cols., 2002).

En la corteza prefrontal, los cambios en la función dopaminérgica pueden producir un desequilibrio entre los receptores D_1 y D_2 , con un predominio de las funciones inhibitorias de esta estructura. La inervación dopaminérgica de la amígdala y su interacción con el núcleo accumbens desempeña un papel esencial en el condicionamiento de estímulos ambientales, capaces de desencadenar el deseo de consumo y la recaída. En pacientes dependientes, los cambios dopaminérgicos se extienden desde las regiones límbicas a las asociativas y sensoriomotoras del estriado, y afectan a los circuitos corticoestriatocorticales (Corominas, 2007).

La hipofunción dopaminérgica endógena se ha observado durante la abstinencia de las distintas drogas de abuso, cocaína (*Ackerman y White, 1992*); (*Wu, y cols., 1997*), morfina (*Acquas y Di, 1992*), alcohol (*Diana y cols., 1993*) y nicotina (*Hildebrand y cols., 1998*), y afecta de manera especial al estriado ventral (*Heinz y cols., 2005*). Durante la abstinencia, la hipofuncionalidad dopaminérgica se asocia a cambios neuroadaptativos que afectan, principalmente, a los circuitos de la recompensa. Un aumento de la actividad del AMPc y del factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*) en el núcleo *accumbens* (NAc) originan una hipoactividad en los circuitos de la recompensa que podría ser responsable del estado de ánimo disfórico durante las primeras fases de la abstinencia (*Nestler, 2001*). Además AMPc y CREB son responsables de un aumento de la expresión del péptido opioide dinorfina en algunas de las neuronas del NAc. La dinorfina produce una disminución de la liberación de dopamina en el NAc que acentuaría el estado de ánimo disfórico en la abstinencia (*Heinz y cols., 2005; Nestler, 2001*). El déficit en la actividad dopaminérgica durante el curso crónico podría contribuir a los fenómenos de hipersensibilidad dopaminérgica descritos en los modelos experimentales (*Robinson y Berridge, 1993*) y podría ser uno de los sustratos neurobiológicos de la recaída en el consumo.

En las últimas décadas se han realizado grandes avances en el conocimiento de las bases neurobiológicas de la adicción, lo que ha permitido cambiar completamente la conceptualización de este trastorno, que ha evolucionado hasta contemplarse como un trastorno cerebral crónico que requiere de tratamientos médicos adecuados (*OMS, 2008*). Sin embargo, hay aspectos cruciales del proceso adictivo que permanecen todavía sin resolver. Uno de ellos es el deseo intenso de consumo, que constituye uno de los mayores problemas con que se enfrenta el paciente adicto desintoxicado durante la abstinencia, y otro, no menos importante, los mecanismos neurobiológicos y psicopatológicos que subyacen a las frecuentes recaídas en los hábitos tóxicos, que se presentan incluso después de mucho tiempo de abstinencia (*Corominas, 2007*).

1.4. GENÉTICA DE LA DROGODEPENDENCIA

El riesgo para el inicio del consumo de sustancias y para el desarrollo de una conducta adictiva se asocia a factores genéticos, epigenéticos y ambientales. El equilibrio entre el individuo, el ambiente y la sustancia puede inclinarse a favor del trastorno adictivo en las siguientes situaciones: consumo excesivo mantenido, escasa protección ambiental y vulnerabilidad biológica. La vulnerabilidad individual desde el consumo de la droga hacia la adicción propiamente dicha es un rasgo complejo donde intervienen múltiples factores biológicos y ambientales, sus interacciones y el contacto con la sustancia de abuso (*Lorenzo, 2009*).

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la adicción podríamos citar el estrés, el aprendizaje (*Goodman y Packard, 2016*), el trauma como abuso físico o sexual y la exposición a la droga a edades tempranas (*NIDA, 2011*). Esta última puede inducir neuroadaptaciones cerebrales de manera que aumenta el riesgo de sufrir trastornos psicológicos o psiquiátricos que aparecen de forma concomitante a la adicción (*NIDA, 2011*).

Desde el punto de vista genético, el desarrollo de la drogodependencia es el resultado de la interacción de muchos genes, cada uno con un efecto aditivo sobre los demás (*Altman y cols. 1996; Crabbe y cols. 1994*). Las variaciones genéticas hereditarias explican las diferencias interindividuales en cuanto a la vulnerabilidad al abuso y dependencia a las drogas (*Uhl, 2004*). Los indicios se remontan al año 1990, momento en el que se comprobó mediante estudios de asociación en pacientes adictos, como variaciones genéticas están implicadas en una mayor susceptibilidad a la dependencia de sustancias psicoactivas (*Blum y cols., 1990*). Desde ese momento, diferentes líneas de investigación buscan una asociación entre variantes génicas en la población y el fenotipo clínico que hace a los individuos más sensibles al consumo y dependencia a sustancias (Yang y col., 2008; *Mota y cols., 2012*), todo ello gracias al avance en técnicas de biología molecular que permiten el análisis de polimorfismos en la población (*Li y Burmeister, 2009*).

Recientemente se ha progresado mucho en la identificación de los genes que pueden contribuir a la aparición de dependencias (*Gelernter y col., 2014*). Dentro del conjunto de genes candidatos, cobrarán mayor relevancia, aquellos que codifiquen para proteínas o enzimas implicadas en el metabolismo de la sustancia psicoactiva consumida, o genes implicados en la ruta dopaminérgica mesolímbica responsable de los comportamientos reforzadores y mecanismos de recompensa que sustentan la base neurobiológica de la drogadicción (*Saiz e Ibáñez, 1997*).

Se ha estudiado la relación que existe entre variantes polimórficas en genes que codifican para la enzima tirosina hidroxilasa y la catecol-O-metiltransferasa (*Lohoff y cols., 2008*), implicadas en la síntesis y degradación de la dopamina respectivamente. Asimismo, se han analizado variantes en el gen que codifica para el transportador de la dopamina y para el portador vesicular de monoaminas (*Heinz y Goldman, 2000*). Sin embargo, los genes más ampliamente estudiados son aquellos que codifican para los receptores de la dopamina (D1,D2,D3,D4) (*Messas y col., 2005*). De las variantes genéticas, la más estudiada ha sido el polimorfismo TaqIA por su cercanía al gen que codifica para el receptor D₂ de dopamina (*Noble, 2000; Li y cols., 2004*).

1.4.1. Gen *DRD2*

El gen *DRD2* fue clonado por primera vez en el año 1989 (*Grandy, 1989*). Se localiza en el brazo largo del cromosoma 11, concretamente en la región 11q23.2 y tiene un tamaño de 66 Kb. Codifica para el subtipo D2 de los receptores de dopamina que contiene 443 aminoácidos. Este receptor es una proteína G que inhibe la actividad adenilil ciclasa (AC). Las variantes genéticas del gen han sido de gran interés en estudios de asociación.

Las variantes en este gen son las más estudiadas hasta el momento. Principalmente los polimorfismos *DRD2 TaqIA*, *DRD2 TaqIB* y *DRD2-141 Ins/Del*

- ***DRD2 TaqIA*** es un polimorfismo detectado a nivel de RFLP, con 2 alelos descritos: *DRD2 TaqI A₁* y *DRD2 TaqI A₂*, cerca del extremo 3' (*Grandy D.K. y cols. 1993*)
- ***DRD2 TaqIB*** es un polimorfismo detectado a nivel de RFLP, con 2 alelos descritos: *DRD2 TaqI B₁* y *DRD2 TaqI B₂*, cerca del extremo 5' (*Hauge X.Y. y cols. 1991*)
- ***DRD2-141C Ins/Del*** es un polimorfismo a nivel de inserción/delección de una citosina en la posición -141 (*Arinami T. y cols. 1997*)

Se ha encontrado asociación entre los polimorfismo y la densidad de receptores, que presenta una gran variabilidad a nivel interindividual. Concretamente, se confirmó la relación entre el alelo A₁ y el alelo B₁ con una baja densidad de receptores D2 (*Jönsson E.G. y cols. 1999*); así como una relación de los mismos con la vulnerabilidad al abuso de sustancias.

Esto confirmaría la hipótesis de grupos como el de Ebstein y Belmaker que sugieren que las personas que se vuelven adictas a ciertas sustancias podrían tener una alteración genética que supondría una deficiencia en el sistema de recompensa cerebral (*Ebstein y Belmaker, 1997*). Así, en un esfuerzo por compensar las deficiencias en el sistema dopaminérgico (*Khantzian, 1985*), estas personas pueden tratar de estimular los circuitos mesocorticolímbicos del cerebro, mediante el consumo de sustancias que aumentan los niveles de dopamina en el cerebro (*Noble y cols., 2000*)

Sin duda, una de las variantes genéticas más estudiadas en un conjunto amplio de trastornos psiquiátricos y rasgos de personalidad ha sido el polimorfismo TaqIA (*Tierney y cols., 2000*). Desde que se relacionó por primera vez el alelo A₁ del gen *DRD2* y el alcoholismo (*Blum y cols., 1990*), se han ido sucediendo los estudios de asociación para todas las adicciones. Asimismo, desempeña un papel importante en las adicciones no químicas, como el juego patológico (*Comings y cols., 1996*).

Aunque en un principio se creía que este polimorfismo se encontraba en el gen *DRD2*, ahora se sabe que está en el exón 8 de un gen denominado *ANKK1*. En el año 2010, un grupo español caracterizó por primera vez la proteína ANKK1 y presentó el patrón de expresión del gen *ANKK1*. Esta nueva proteína se expresa en los astrocitos del sistema nervioso central (SNC) adulto de humanos y roedores, y en la glia radial del SNC en desarrollo (*Hoienicka y col., 2010*). Este hallazgo ha abierto un debate sobre la posible relación que puede existir entre la proteína ANKK1, el receptor D2 de dopamina y el sistema dopaminérgico.

En el año 2006 el grupo de Gelernter comienza el estudio de una región cromosómica que comprende varios genes interconectados, entre ellos el gen *DRD2* y el gen *ANKK1*, a la que atribuyen un grado de ligamiento o *LOD score* de 1.97 para adicción a drogas. Parece cada vez más lógico estudiar haplotipos o variantes génicas que se heredan juntas y que predisponen a padecer esta patología (*Gelernter y cols., 2006*).

1.4.2. Genes contiguos a *DRD2*: *ANKK1-TTC12-NCAM1* (Región NTAD)

En el cromosoma 11, concretamente en la región 11q23, se localiza un grupo de genes *DRD2-ANKK1-TTC12-NCAM1* que constituyen un bloque genético de 542 Kb (*Gelernter y cols., 2006*), relacionados con procesos de neurogénesis y mecanismos de transmisión de señales. Este grupo de genes está muy conservado en la escala evolutiva y parece ser que se estableció hace 400 millones de años cuando el sistema nervioso central aumentó en complejidad (*Mota y cols., 2012*).

No es casualidad que estos genes se agrupen en un orden determinado en el cromosoma (Figura 7). Probablemente la configuración que adquieren confiere ciertas ventajas adaptativas al individuo. Se conoce que los genes que se regulan y se expresan juntos comparten funciones y se agrupan en bloques genéticos que se mantienen en el tiempo por la presión que ejerce la selección natural (*Sémon y Duret, 2006; Michalak, 2008*).

El gen *NCAM1* (*neural cell adhesion molecule 1*) se localiza 120 Kb corriente abajo del gen *DRD2*. Es el más grande de los cuatro que componen la región NTAD, tiene un tamaño de 317 Kb, contiene 20 exones y codifica una glicoproteína transmembrana de 858 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (*Cunningham y cols., 1987*). Estructuralmente consta de un dominio extracelular (aminoácidos 20-718), un dominio transmembrana de 20 aminoácidos y un dominio citoplasmático (aminoácidos 740-858). La proteína está implicada en varias funciones neuronales mediando como molécula de adhesión celular entre neuronas y entre neuronas y músculo, participa en la estabilidad sináptica y en la plasticidad (*Cambon y cols., 2004*). Está implicada en fenómenos de consolidación de memoria y aprendizaje y juega un papel importante en la neurogénesis, concretamente en el crecimiento dendrítico y axonal (*McIntyre y cols., 2010*). Su desregulación en el cerebro podría contribuir a la fisiopatología de desórdenes neuropsiquiátricos (*Vawter, 2000*).

El gen *TTC12* está localizado entre los genes *NCAM1* y *ANKK1*, se expande 69 Kb y contiene 22 exones. Codifica una proteína citoplasmática llamada TPARM de 705 aminoácidos con posibles funciones en la vía de transmisión dopaminérgica y en el desarrollo neuronal mediante la ruta de señalización Wnt (*Castelo-Branco y Arenas, 2006*). Incluye un dominio de repetición tetratricopéptido (TPR) y 3 dominios con repeticiones armadillo (ARM) (*Katoh y Katoh, 2003*). Su dominio ARM parece jugar varios papeles a nivel celular que incluyen regulación del ensamblaje de desmosomas, adhesión celular, neurogénesis y transducción de señal.

El gen *ANKK1* contiene 8 exones y se encuentra a menos de 10 Kb corriente a bajo del gen *DRD2*, codifica una proteína de 765 aminoácidos con actividad de serina treonina quinasa (Neville y cols., 2004). Esta proteína citoplasmática desempeña diversas funciones celulares, muchas de ellas en relación con la mediación de la respuesta de las células eucariotas a los estímulos externos (Hanks y Hunter, 1995). Está asociada con los mecanismos que median en la atención en el cortex del cíngulo anterior, una región del cerebro muy rica en dopamina (Fossella y cols., 2006).

Como ya se ha mencionado, el polimorfismo TaqIA es un marcador del gen *ANKK1*. El cambio de una Adenina por una Guanina en la secuencia genética provoca un cambio de aminoácidos en la proteína. Por su cercanía con el gen *DRD2*, se encuentra en desequilibrio de ligamiento con varios polimorfismos, entre ellos los polimorfismos rs2283265 y rs1076560 que determinan la ratio entre los receptores D_{2L} y D_{2S} (Zhang y cols., 2007). Así pues un polimorfismo en un gen puede asociarse con la expresión del gen contiguo por estar en desequilibrio de ligamiento con la variante funcional. Los genes *ANKK1* y *DRD2* están relacionados e implicados en el funcionamiento del sistema dopaminérgico (Mota y cols., 2012), incluso podrían establecerse relaciones entre las proteínas codificadas por ellos.

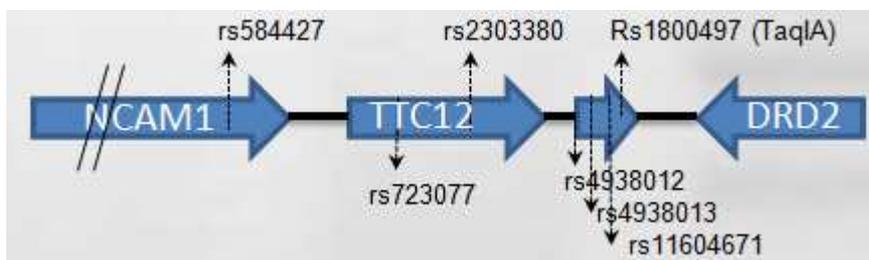


Figura 7: Genes de la región NTAD y polimorfismos seleccionados

El estudio de las bases biológicas de las drogodependencias en 632 familias con 43 SNP distribuidos en estos cuatro genes reveló la asociación a la nicotina y todos los genes de este cluster. Los valores más débiles fueron para los genes *DRD2* y *NCAM1* y los valores más significativos fueron para los genes *ANKK1* y *TTC12* (Gelernter, 2006).

Un estudio similar realizado en pacientes y familias con alcoholismo del estudio COGA (Collaborative Study on the Genetic of Alcoholism) con los mismos 43 SNP identificaron una asociación de este trastorno con el exón 3 del gen *TTC12*, el exón12/intrón 13 del gen *NCAM 1* y los exones 2 y 5 del gen *ANKK1* (Yang y cols., 2008).

1.4.3. Otras alternativas de variación genética.

Las nuevas perspectivas se orientan a investigar sobre la plasticidad neuronal y se sustentan en la idea de que la exposición a la droga produce neuroadaptaciones en los circuitos cerebrales que serán responsables del estado de adicción. Estas modificaciones cerebrales parecen estar asociadas con mecanismos que regulan la expresión génica de forma reversible y estable (*Sartor y col., 2015*).

Existen mecanismos específicos que regulan la expresión génica, mediante la remodelación de la estructura de cromatina provocada por un proceso de metilación del ADN o modificación de histonas. Este mecanismo de regulación es conocido con el nombre de Epigenética y el papel que se le atribuye en las conductas adictivas es relativamente nuevo (*Wong, 2011*). Se sabe que existen cambios epigenéticos tras la exposición a drogas de abuso (*Robinson y Nestler, 2011*). Una hipótesis actual es que la exposición a drogas de abuso provoca modificaciones epigenéticas estables que alteran la expresión génica responsable de los cambios neuroadaptativos en el estado de adicción (*Wong, 2011*).

Aunque se han descrito cambios epigenéticos en varias adicciones como alcohol, anfetaminas y cocaína, los mejor caracterizados son los relacionados con esta última droga. Se ha probado que estos cambios son esenciales para el desarrollo de la neuroplasticidad asociada al consumo de cocaína (*Sartor y col., 2015*). El consumo de cocaína reduce los niveles de metilación de histonas en el núcleo *accumbens*, debido a represión de la expresión de la histona metiltransferasa G9a (*Benevento y cols., 2015*). Asimismo, la motivación y mecanismo de refuerzo para el consumo de cocaína se han relacionado con alteraciones en la acetilación de la histona H3 en el núcleo *accumbens* y con hipometilación del ADN atribuida a una reducción en los niveles de ADN metiltransferasa en la corteza prefrontal (*Li y cols., 2015*).

Las enzimas responsables de las variaciones epigenéticas también son objeto de estudio. Las enzimas de la familia PARP-1 utilizan NAD^+ como sustrato para transferir ADP-ribosa a residuos de ácidos aspártico y glutamínico en proteínas aceptoras, incluidas las PARP, las histonas, los factores de transcripción y las proteínas reparadores del ADN (*De Murcia y Shall, 2000*).

Los niveles de la enzima PARP-1 aumentan con el consumo crónico de cocaína y genera modificaciones transitorias de proteínas nucleares en ratones (*Yang y Choe, 2010*). Los investigadores observaron que la sobreexpresión no sólo aumentó los efectos gratificantes de la cocaína sino que también indujo cambios en la morfología y las conexiones sinápticas de las neuronas en esta región de recompensa del cerebro (*Scobie y cols., 2014*). Sería interesante identificar los genes que son alterados a través de los cambios epigenéticos inducidos por PARP-1.

Otro mecanismo de regulación génica que actualmente está cobrando importancia es el ejercido por los micro-ARN (miARN), ARN monocatenarios y complementarios de una parte de uno o más ARN mensajeros (ARNm) que inhiben su traducción (*Ramoz y Gorwood, 2015*). Estos miARN juegan un papel regulador clave en los procesos celulares tales como neurogénesis, conexiones sinápticas y plasticidad neuronal y son diana de genes implicados en el mecanismo de consolidación de la adicción (*Kenny, 2014*). Por este camino, muchos científicos buscan la relación que estos pequeños miARN pueden tener en la adicción a la cocaína y aunque de momento se utilizan modelos animales, los resultados moleculares podrían ser extrapolables al ser humano.

Se han publicado artículos en los que se defiende el efecto protector del microARN 212 contra la adicción a la cocaína, de modo que el bloqueo de su señalización puede aumentar la vulnerabilidad a la adicción (*Hollander, 2010; Sadakierska-Chudy y col., 2016*). Analizando los cerebros de roedores, se observó un aumento de la expresión de miR-212 como respuesta al consumo elevado de cocaína valorándolo como factor de protección ya que la expresión de miR-212 de forma artificial limita el consumo de cocaína y viceversa (*Hollander, 2010*). Las moléculas que regulan la expresión de este microARN podrían ser un buen comienzo para nuevos estudios.

También se ha descrito que la cocaína disminuye el microARN 133b, lo que aumenta la función del factor de transcripción Pitx3 y esto, a su vez, incrementa la dopamina y la actividad de los receptores dopaminérgicos. En este estudio se baraja la posibilidad de que los hijos de madres consumidoras de cocaína podrían tener una mayor predisposición hacia la adicción si prueban esta sustancia, pues durante el estado embrionario se generaría una alteración del sistema dopaminérgico que predispone al consumo posterior (*Barreto-Valer y col., 2012*).

1.5. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y SUS LIMITACIONES

Son numerosos los estudios de investigación que tratan de analizar los factores condicionantes que han motivado el desarrollo de una determinada enfermedad. En muchas ocasiones estos factores condicionantes son genéticos y por lo general, dependen de la acción combinada de un gran número de genes (*Nestler, 2000*). Pero existen más factores implicados en que una determinada enfermedad se manifieste como pueden ser los condicionantes ambientales (*Kaufmann y col., 1996*).

La heredabilidad de la drogodependencia es un parámetro poblacional que establece la proporción de la varianza fenotípica que es atribuible a la varianza genética, se determina a través de distintos estudios de epidemiología genética, que trata de estudiar la coincidencia en la presentación del trastorno en miembros de la misma familia, con especial interés en los gemelos. En un estudio que compara cohortes amplias de gemelos y mellizos, encuentran una heredabilidad para los trastornos adictivos de moderada a alta que oscila entre 39% para el caso de los alucinógenos y 72% para el caso de la cocaína (*Goldman y col., 2005*).

Una vez establecido que los factores genéticos juegan un papel en la susceptibilidad a la enfermedad estudiada, el segundo paso es identificar estos factores y en el caso de enfermedades complejas, la mejor forma es mediante estudios de asociación, pues parecen ser los más potentes para detectar alelos comunes que confieren un riesgo moderado y por consiguiente, para evaluar la relación existente entre una región específica del genoma y la enfermedad. Para ello se analizan los polimorfismos genéticos, variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, transmitiéndose a la descendencia y adquiriendo cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Son la base de la evolución y los que se consolidan, pueden ser silentes o proporcionar ventajas adaptativas a los individuos, aunque también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades (*Guttmacher y Collins, 2002*). Se pueden distinguir dos tipos en cuanto a relación con la enfermedad, las variantes de alta penetrancia con baja frecuencia en la población pero donde los portadores suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad, y las variantes de baja penetrancia que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad, de forma que para que dicha variante se exprese, es necesario una exposición (*Porta, 2003*).

Las variantes genéticas más frecuentes en el genoma son los conocidos como los polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms* o SNP). Están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma y se ha estimado que hay una variante por cada 1.000- 2.000 pares de bases. Esto hace que sean de gran utilidad en la caracterización de rasgos fenotípicos y en el estudio de enfermedades lo que los convierte en el mejor marcador genético para estudios de asociación (*Sachidanandam y cols. 2001*).

Los estudios de asociación comparan las frecuencias y distribuciones alélicas de marcadores genéticos polimórficos en dos poblaciones, una con un determinado trastorno y otra sin el mismo que se utiliza como control. Cuando la frecuencia de algún alelo marcador es significativamente mayor en la población de enfermos, el resultado es una asociación positiva y puede indicar entre otras interpretaciones una relación causal entre el alelo y el trastorno, o bien un efecto sobre la susceptibilidad para la enfermedad (*Ibáñez Cuadrado, 2008*).

Actualmente, las nuevas estrategias de abordaje genómico van dejando de lado el análisis de genes individuales y centran su atención en un análisis colectivo o grupo de genes relacionados. Para ello, se recurre al análisis combinado de varios marcadores a lo largo de las regiones que contienen los genes seleccionados (*Gelernter y col., 2006; Yang y col., 2008*).

La evidencia de que el genoma humano está constituido por bloques haplotípicos con apenas recombinación dentro de cada bloque, abrió una nueva etapa de investigación (*Gabriel y col., 2002*). Ahora sabemos que hay segmentos de cromosomas ancestrales que no se han roto por recombinación y que están separados por segmentos donde la recombinación es frecuente, estos segmentos son los bloques haplotípicos. El proyecto HapMap tiene como finalidad definir los bloques haplotípicos en las principales poblaciones (*International HapMap Consortium, 2003*). Si conociésemos la estructura de estos bloques e identificásemos los SNP que definen la variación en cada bloque, podríamos reducir muy significativamente el número de SNP necesarios para un estudio de asociación (*Carracedo, 2007*).

Para acelerar el proceso de identificación de genes se han desarrollado estrategias que permiten la genotipación de alto rendimiento de miles de polimorfismos en cientos o miles de individuos y con ello se generan herramientas excepcionales para el descubrimiento de genes/polimorfismos de gran relevancia para la investigación biomédica (*Drgon y cols., 2010*).

El mayor acceso a las técnicas de genotipado de alto rendimiento, así como los avances en el proyecto HapMap (*International HapMap Consortium, 2005*) y el continuo aporte de nuevos marcadores a las bases de datos, están ayudando a homogeneizar la metodología de los estudios de asociación y hacerlos más consistentes para tener una visión más amplia que nos permita entender mejor el componente genético que subyace a las enfermedades complejas (*Carracedo, 2007*).

Los estudios de asociación genética en rasgos complejos, presentan hasta el momento algunos desafíos adicionales a los tecnológicos y logísticos, pues arrastran problemas en cuanto a su reproducibilidad. La posible causa de tales inconsistencias podría trasladarse al grado de desequilibrio de ligamiento que se observa en los distintos grupos étnicos, de forma que el marcador seleccionado y con significancia estadística, puede encontrarse en el mismo bloque de ligamiento que la variante funcional en la población estudiada y sin embargo el mismo marcador en otra población no arrojar los mismos resultados por no encontrarse en desequilibrio de ligamiento con la variante funcional. Otra posible explicación haría alusión a la existencia de una verdadera heterogeneidad entre los estudios comparados, pues pueden ocultarse diferencias en cuanto a la selección del grupo control, del grupo de pacientes que pueden tener comorbidades asociadas o por estratificación de las muestras. También es posible que las variantes causales contribuyan con un modesto efecto al riesgo de la enfermedad, por lo que se requiere aumentar el tamaño muestral para conseguir un mayor poder estadístico y no todos los estudios alcanzan un número de casos comparable. Sin embargo, este problema se soluciona ampliando el análisis a escala genómica, son los conocidos como estudios de asociación genómica (*genome-wide association studies* o GWAS)

Los estudios GWAS, se están imponiendo como una de las mejores estrategias a la hora de estudiar las bases genéticas en enfermedades complejas (*Gelernter y col., 2014*), pues se realiza un cribado extenso y de alta densidad en busca de zonas de significativa asociación con el fenotipo estudiado (*Ramoz y Gorwood, 2015*). Se han identificado más de 50 genes con alguna variante que presenta una asociación significativa para la drogodependencia, muchas de éstas variantes están presentes también en pacientes dependientes a cocaína (*Drgon y cols., 2010*). Sin embargo, se ha comprobado que en el caso de enfermedades comunes, generalmente poligénicas, disminuye notablemente la potencia para detectar SNP asociados verdaderamente con la enfermedad (*Riancho 2012*). Esto es así, porque se están utilizando herramientas bioinformáticas que tratan de responder preguntas que no son realmente las más adecuadas y correctas en el caso de enfermedades poligénicas, por eso sigue siendo necesario validar los resultados obtenidos en estudios de asociación.

Sin duda, en las enfermedades complejas existe una interacción compleja entre factores genéticos como ocurre en el caso de las adicciones. Por tanto, el análisis de interacciones entre variantes polimórficas de diferentes genes candidatos puede ser una estrategia eficaz para identificar posibles relaciones entre los genes y la expresión del fenotipo. Estos estudios de interacción facilitarían la comprensión de las relaciones entre genes cercanos como los de la región NTAD del cromosoma 11 y su implicación en el desarrollo del proceso adictivo.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Existe un grupo de genes que codifican para proteínas con funciones relevantes en la vía de transmisión dopaminérgica asociada al sistema de recompensa cerebral que se activa, entre otras muchas situaciones, tras el consumo de drogas de abuso como la cocaína. Por tanto, estos genes resultan claros candidatos para evaluar la importancia que pueden tener los factores genéticos en el desarrollo de la conducta adictiva.

Como objetivo de la investigación se considera esencial identificar variantes genéticas en los genes candidatos que, de manera individual o en combinación, definan perfiles heredados capaces de explicar la predisposición a desarrollar dependencia hacia la cocaína y asimismo analizar si el sexo es una variable dependiente en el comportamiento adictivo.

Para ello, se estudiarán una serie de polimorfismos localizados a lo largo de una amplia región genómica (~542 kb) en el cromosoma 11q23 que comprende un grupo de cuatro genes relacionados en la vía dopaminérgica (NCAM1, TTC12, ANKK1 y DRD2).

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio se diseñó con el objetivo de relacionar distintos polimorfismos genéticos localizados en una región clave para la ruta dopaminérgica con la predisposición a consumir cocaína. Estos polimorfismos, numerados en orden consecutivo según su situación desde el centrómero hasta el telómero del brazo largo del cromosoma 11 (rs584427, rs723077, rs2303380, rs4938012, rs4938013, rs11604671, rs1800497), fueron seleccionados teniendo en cuenta la significancia acumulada en artículos previos, la frecuencia del alelo menor, la repercusión que pudieran tener en la síntesis o estructura de la proteína y el desequilibrio de ligamiento con el resto de variantes.

Para desarrollar el proyecto, se realizó un estudio observacional caso-control con pacientes adictos a la cocaína (casos) e individuos no consumidores de ninguna sustancia adictiva de la población general (controles).

3.2. SUJETOS A ESTUDIO

Es muy importante establecer unos criterios de inclusión *a priori* para asegurar una buena selección de la muestra y evitar sesgos que interfieran en los análisis estadísticos. Por ello, se elabora una encuesta sobre hábitos de consumo que el paciente completará durante una entrevista y que confirmará la idoneidad del paciente. Además, en el estudio se incluirán pacientes reclutados de distintos centros de la Comunidad Autónoma de Aragón, integrando en el estudio los diferentes sectores que conforman el mapa autonómico y evitando así la estratificación de la muestra.

3.2.1. Reclutamiento de pacientes

El grupo a estudio lo han formado 100 voluntarios de etnia caucásica dependientes a cocaína, procedentes de las Unidades de Atención y Seguimiento de Adicciones de Aragón (Salud, CMAPA, Centro de Solidaridad, Cruz Roja, Cinco Villas, Huesca, Sector Barbastro) y de la Asociación Azajer, reclutados durante el período comprendido entre los años 2010-2013. Todos estaban emprendiendo un programa médico de deshabituación.

Los pacientes seleccionados debían reunir una serie de requisitos previos:

- Tener más de dieciocho años
- Cumplir con los criterios diagnósticos del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV) para dependencia a cocaína (ANEXO V)
- No estar emparentados con otros participantes en el estudio, descartándose aquellos con algún tipo de vinculación familiar para evitar consanguinidad en las muestras.
- La sustancia consumida principalmente será la cocaína, no descartando aquellos pacientes que practiquen el policonsumo, con la condición de que el consumo de la cocaína supere el gramo por semana
- No tener ninguna complicación médica relacionada con el consumo de sustancias que le impida participar en el estudio.
- Tener las facultades físicas y mentalmente suficientes para emprender una entrevista clínica

Los pacientes seleccionados fueron citados para una entrevista clínica donde se les realizó una encuesta, en la que se registraron variables socio-demográficas y de hábitos tóxicos, así como antecedentes familiares y tratamiento recibido (ANEXO II). Se les explicó el motivo del estudio, su contribución en el mismo y el método empleado para la obtención de la muestra (ANEXO III). Una vez aclaradas todas sus dudas, firmaron el consentimiento informado que garantiza la total confidencialidad y anonimato (ANEXO IV).

Durante el período de selección, se escogió un grupo de pacientes que cumplía todos los criterios. Se excluyó a un 15 % del grupo potencial de pacientes que referían un consumo ocasional y por tanto poco frecuente. Adicionalmente se descartó un 13% de los pacientes por la negativa a participar.

3.2.2. Controles poblacionales

Paralelamente y como grupo control, se ha utilizado sangre procedente de 85 donantes anónimos, recogida del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, previo consentimiento informado proporcionado por escrito para participar en este estudio. De estos individuos se recogieron datos socio-demográficos y de hábitos tóxicos, siendo excluidos aquellos individuos que consumían cualquier tipo de sustancias de abuso.

3.2.3. Consentimiento informado

El protocolo y el formulario de consentimiento informado propuesto, fueron revisados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). El grupo de investigación se comprometió a respetar los principios de la Declaración de Helsinki, debiendo desarrollar el estudio de acuerdo con el protocolo y con procedimientos normalizados de trabajo que aseguren el cumplimiento de las normas de Buena Práctica Clínica (BPC). Cualquier modificación del protocolo ha sido siempre presentada como una nueva versión del protocolo con la debida aprobación del CEICA (ANEXO I). La confidencialidad de los datos de cada paciente ha sido respetada en todo momento.

Los datos originales han sido conservados en el centro hospitalario donde se ha llevado a cabo la investigación y sólo han tenido acceso los investigadores del estudio.

3.2.4. Limitaciones

En un principio se pensó incluir en el estudio sólo a aquellos pacientes con dependencia exclusiva a la cocaína pero a pesar de que la cocaína es la segunda droga psicoactiva ilegal en cuanto a prevalencias de consumo a nivel nacional, actualmente el policonsumo constituye el modelo más frecuente. Resulta por tanto muy difícil excluir los casos que combinan un consumo con otras drogas, sin irremediablemente reducir el tamaño muestral y con ello el poder estadístico. Por eso, en este caso se ha optado por incluir a pacientes que consumen otras drogas siempre y cuando la cocaína sea la de consumo principal con dependencia demostrada (Criterios Diagnósticos DSM-IV), con el propósito de obtener un tamaño muestral suficientemente grande y con ello conseguir el mayor poder estadístico posible para poder afirmar que cualquier diferencia observada entre los pacientes y el grupo control no se deba al azar.

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

Para analizar la asociación entre los distintos polimorfismos y la predisposición genética a la dependencia, se genotiparon todos los marcadores seleccionados en los 85 controles y los 100 pacientes. Para el genotipado de estos marcadores se recurre a distintas metodologías, manuales y de alto rendimiento con plataformas de genotipado. No obstante, ambos métodos requieren la extracción previa y posterior amplificación del material genético. Las estrategias manuales se fundamentan en la amplificación de una región de ADN de tamaño discreto (de 100 a 300 pb,

aproximadamente) que contiene el polimorfismo seleccionado, una vez aislado y amplificado el fragmento de interés, se realiza el genotipado analizando el tamaño de los fragmentos resultantes ya que el polimorfismo TaqIA genera una diana para una enzima de restricción (RFLP). El resto de SNP se genotipan mediante las plataformas de alto rendimiento, esta tecnología se utiliza cada vez con más frecuencia y es muy útil para genotipar un conjunto grande de SNP simultáneamente.

3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN

Una vez recogidas las muestras de sangre de cada individuo, se procedió al aislamiento de ADN genómico de las células leucocitarias por columna de afinidad a partir de 300µL de sangre venosa. Para ello hemos usado el kit de extracción de ADN (GenElute™ Blood Genomic ADN Kit) NA2010 de Sigma-Aldrich®.

La cantidad de ADN extraída se determinó mediante lectura continua de densidad óptica (A_{260}) en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 de Thermo Scientific™. La calidad del mismo se estableció mediante los ratios A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} , para comprobar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a sales, alcoholes y otros reactivos y a proteínas respectivamente. Este último, especialmente importante por permitir descartar contaminación proteica. Se consideran valores aceptables los comprendidos entre 1.6 y 2.0; siendo el óptimo 1.8. Los valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos. Los valores superiores orientan hacia un exceso de ARN en la muestra.

Para igualar las concentraciones de las muestras, se diluyeron con agua Milli-Q® hasta una concentración final entorno a 20 µM. Finalmente las muestras de ADN se conservaron en tubos Eppendorf® y se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C hasta su utilización, con el fin de evitar la degradación progresiva o una posible contaminación.

3.3.2. Procedimiento para el genotipado del polimorfismo TaqIA

3.3.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA

La secuencia genómica de 310 pares de bases (pb) correspondiente al polimorfismo TaqIA del gen *DRD2* se amplificó utilizando la reacción en cadena de la ADN polimerasa (*Polymerase chain reaction* o PCR). La elección de los oligonucleótidos que delimitan la secuencia a estudio es uno de los puntos críticos a tener en cuenta y determinan el óptimo rendimiento del proceso. En este caso, se utilizaron los propuestos por Grandy en 1993 que se definen a continuación:

| | | | |
|----|----------------------------|----|-----------|
| 5' | CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA | 3' | (forward) |
| 5' | CCGTCGACCCTTCTGAGTGTCATCA | 3' | (reverse) |

Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados y distribuidos por Invitrogen S.A. y reconstituidos a 100 μ M para obtener la solución stock, a partir de la misma se realizan alícuotas con una concentración final de 12,5 μ M y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Siguiendo una modificación del protocolo de Grandy (*Grandy y cols., 1993*), cada reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 28 μ l, de los cuales, 25 μ l corresponden a Taq-PCR master-mix de Thermo Scientific™, 1 μ l por cada uno de los oligonucleótidos (12,5 μ M) y 1 μ l al ADN genómico total (50 ng). Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el ADN molde que será sustituido por la misma cantidad de agua libre de nucleasas.

Después de establecer las condiciones óptimas, la reacción se realiza en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 de Biosystems bajo las condiciones detalladas en la Tabla 2, prestando especial atención a la concentración de los reactivos, el número de ciclos y la temperatura de hibridación.

| | Temperatura | Tiempo | |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 94° C | 5' | |
| Desnaturalización | 94° C | 30" | } 35 ciclos |
| Hibridación | 51° C | 30" | |
| Extensión | 72° C | 45" | |
| Extensión final | 72° C | 7' | |

Las reacciones de amplificación se mantienen a 4°C hasta su resolución.

Tabla 2. Condiciones establecidas para realiza la amplificación en cadena de la polimerasa.

3.3.2.2. INCUBACIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN TAQI

Aprovechando la diana enzimática que se genera con el cambio de nucleótido, se incubaron aproximadamente 50 ng del ADN amplificado (10 μ l del producto de la PCR) con 5 unidades de la enzima TaqI (*Thermus aquaticus*) de Sigma-Aldrich®, durante 16 horas a 65 °C.

El genotipado de este marcador se fundamenta en los diferentes fragmentos que se generan tras la acción enzimática. Los fragmentos de 310 pb, previamente amplificados mediante PCR que contienen el alelo A1, no contienen la diana enzimática, por consiguiente el fragmento permanece intacto. Por el contrario, cuando el alelo A2 está presente, el fragmento de ADN se escinde por acción enzimática en dos de 180 y 130 pb. Por tanto, la ausencia/presencia de un sitio adecuado para la acción de la enzima dispone las variantes alélicas, facilitando la interpretación de los genotipos en base al tamaño de los fragmentos de ADN resultantes.

3.3.2.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GELES DE AGAROSA

El genotipado final se resuelve por electroforesis visualizando los productos resultantes de esta reacción en geles de agarosa preparados al 2% con tampón TBE (Tris, Borato, EDTA) y teñidos con bromuro de etidio. Las muestras migraron en paralelo a un marcador de tamaño de ADN de pesos moleculares conocidos (100 pb ADN Ladder).

Para la preparación de los geles se pesaron 3g de agarosa (BP 160-100 de Fisher Scientific™) y se midieron 150 mL de tampón TBE en un Erlenmeyer de 250 ml. Para favorecer la completa disolución de la agarosa, se calentó la mezcla en un microondas y posteriormente se le añadió bromuro de etidio (Tabla 5) hasta una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. La disolución de agarosa fue trasvasada a un molde provisto de un peine para la formación de pocillos donde se deja solidificar durante aproximadamente 40 min.

Una vez formado el gel, éste se introduce dentro de una cubeta de electroforesis (BioRad) con tampón TBE 1X (Tabla 3). Para cargar las muestras en el gel se requiere una mezcla (1:1) con un tampón de carga (Tabla 4) que le proporcione densidad y color. Para la monitorización de la electroforesis se carga en cada pocillo 10 μl de la muestra con 5 μl tampón de carga que contiene azul de bromofenol.

Se le aplica un campo eléctrico constante de 100 mV, hasta que el frente de avance alcance dos tercios del gel. La presencia de los fragmentos de ADN se comprueba en un transiluminador con luz ultravioleta de Bio-Rad Laboratories. Las imágenes son editadas en el programa Quantity One 4.6.9

PACIENTES Y MÉTODOS

| Reactivos | Propiedades | Cantidad |
|--|---|--------------------|
| Tris-(hidroximetil)-aminometano | Regulación del pH. | 11 g |
| Ácido Bórico | Mantener el pH | 5.5 g |
| EDTA 0.5 M (pH=8) (Ácido Etilendiaminotetraacético) | Quelante de Mg ⁺² Evita la degradación de ADN por las nucleasas | 4 mL |
| Agua destilada | | Completar hasta 1L |

Tabla 3. Tampón de electroforesis TBE 1X

| Reactivos | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Glicerol | 30% |
| TBE | 60% |
| Azul de Bromofenol | 2.5% |

Tabla 4. Tampón de carga 2X

| Reactivos | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Bromuro de Etidio | 50 µl |
| Tris 1X | 950 µl |

Tabla 5. Composición Bromuro de Etidio

3.3.2.4. GENOTIPADO

El polimorfismo rs1800497 genera una secuencia reconocida por la enzima TaqI que corta el ADN en dos fragmentos de distinto tamaño (Figura 8)

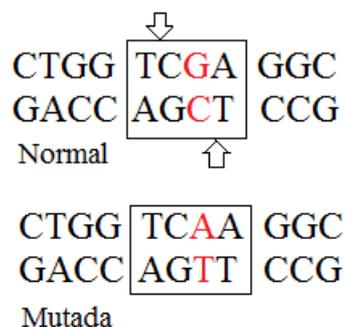


Figura 8. Secuencia de corte de la enzima de restricción TaqI. La enzima reconoce una secuencia específica de cuatro nucleótidos generando extremos cohesivos en ambas hebras.

Esta característica permite genotipar las dos variantes alélicas. Los resultados denotan tres posibilidades que corresponden a los tres genotipos descritos para el polimorfismo TaqIA.

- El homocigoto predominante o *wild type* A_2A_2 : como resultado de la acción enzimática se representa como dos bandas electroforéticas de tamaño 180 y 130 pb.
- El heterocigoto A_1A_2 : al portar las dos variantes del polimorfismo, se dan las dos posibles situaciones y se caracteriza por tres fragmentos electroforéticos de 310, 180 y 130 pb.
- El homocigoto de baja frecuencia o mutado A_1A_1 : no es diana para la enzima de restricción y por tanto, se observa una única banda electroforética de 310 pb que corresponde con el tamaño del fragmento inicial.

3.3.3. Genotipado de los SNP vinculados a la región NTAD

Para las muestras de cada uno de los pacientes así como para las del grupo control se estudiaron además seis variantes dispuestas a lo largo de la región cromosómica 11q23 que incluye los genes *NCAMI*, *TTC12* y *ANKK1*. Se analizó una variante en el gen *NCAMI* (rs584427), dos variantes en el gen *TTC12* (rs723077 y rs2303380) y tres variantes en el gen *ANKK1* (rs4938012, rs4938013 y rs11604671). El genotipado de estos marcadores se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) por espectrometría de masas (MALDI-TOF) en base a la tecnología MassARRAY® de Sequenom™ y empleando la química iPLEX® Gold (Increased Plexing Efficiency and Flexibility).

El desarrollo de técnicas de ionización suaves como el MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) permiten producir moléculas ionizadas intactas que en la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (*Time Of Flight* o TOF) son aceleradas mediante un campo eléctrico y enviadas a un analizador que separa los iones procedentes de la muestra según sus razones de masa y carga. Finalmente los iones impactan contra el detector que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado. La masa molecular puede ser determinada con una elevada precisión (de 0.01 % a 0.1%) y en base a la diferencia de masa atómica que existe entre los dos alelos de cada variante genética es posible genotipar cada SNP.

Previo al análisis, las muestras han de cumplir una serie de requisitos en cuanto a volumen y concentración para un correcto procesado de las mismas que hace de la etapa inicial de preparación de las muestras una de las más importantes del proceso. Para ello, se pipetea 50 μL de cada una de las muestras de ADN con concentraciones comprendidas entre los 20 y 30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ en dos placas de 90 pocillos.

A continuación se procede con el protocolo de trabajo que incluye los siguientes puntos: la realización de una reacción de amplificación (PCR), una etapa de purificación previa a la reacción de extensión de una única base (EXT), una segunda etapa de purificación y la lectura del producto resultante mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF.

3.3.3.1. DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Antes de comenzar la técnica, en primer lugar se diseñan los oligonucleótidos empleados en la reacción de amplificación (Tabla 6) y en la posterior reacción de extensión (Tabla 8). Por un lado obtenemos los oligonucleótidos para amplificar la zona de ADN que contiene cada uno de los marcadores a analizar, y por el otro los empleados para el genotipado del SNP. En este caso, el diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando el programa informático MassARRAY® Assay Design Suite v.3.0, suministrado por Sequenom™.

Este programa permite obtener las regiones de interés a partir de los marcadores que queremos genotipar. El siguiente paso es identificar los SNP secundarios próximos al marcador que queremos genotipar, para evitar diseñar oligonucleótidos sobre aquellas regiones donde estén presentes estos SNP secundarios. Después, el programa se encarga de comprobar que los oligonucleótidos tanto de PCR como de extensión no hibridan en regiones inespecíficas y no forman horquillas ni dímeros entre sí, adjudicándole una puntuación (Tabla7). Las secuencias obtenidas tras la reacción de extensión así como sus masas se recogen en la Tabla 9.

PACIENTES Y MÉTODOS

| SNP | PCR-F | PCR-R |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|
| rs11604671 | ACGTTGGATGAAGGTGTCTGCAAGCTGTC | ACGTTGGATGCTTAGCATGACCATAAGGAC |
| rs4938013 | ACGTTGGATGGAGCCCTTACTTTGACATGC | ACGTTGGATGCTTCTGCACAGCATTAAAGC |
| rs584427 | ACGTTGGATGGGTGCCCATCTCAAATACA | ACGTTGGATGCCTTGGCATCATACCACTTG |
| rs4938012 | ACGTTGGATGACCACAGATAGCATCCAAGC | ACGTTGGATGGGCTCTGGGACATCAATTAG |
| rs2303380 | ACGTTGGATGCCTTCTATCTACTTCAGCCC | ACGTTGGATGATTGTGAGTGGGCTCTCAAG |
| rs723077 | ACGTTGGATGAGGTGTAGGTCTTCTCACTG | ACGTTGGATGGACTATGATCAGTCTCCAC |

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para cada SNP en la reacción de amplificación por PCR.

| Longitud del amplicón | Puntuación amplicón uniplex | Puntuación amplicón multiplex |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 99 | 97,1 | 89,4 |
| 115 | 99,1 | 89,4 |
| 100 | 98,7 | 89,4 |
| 96 | 99,9 | 89,4 |
| 95 | 99,9 | 89,4 |
| 110 | 99,6 | 89,4 |

Tabla 7. Características de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR. La puntuación del amplicón uniplex indica cuanto se ajusta.

| SNP | Secuencia oligonucleótidos | Masa | Tm | Porcentaje GC | Dirección |
|------------|----------------------------|--------|------|---------------|-----------|
| rs11604671 | TGTCGCTGCGCCAGCCC | 5123,3 | 61,8 | 76,5 | F |
| rs4938013 | ATGTTGCTGTCCAGGAG | 5241,4 | 49,3 | 52,9 | R |
| rs584427 | GCTGAGTGGAGAGCAGT | 5315,5 | 51,5 | 58,8 | R |
| rs4938012 | CAGTCAGAGAGACCCCCG | 5478,6 | 54 | 66,7 | R |
| rs2303380 | TCATGTGGGAAAAGAAATAC | 6198,1 | 45,9 | 35 | R |
| rs723077 | TCAATAGAAAAGAAACCTTCA | 6728,4 | 46,2 | 27,3 | R |

Tabla 8. Características de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de extensión: Secuencia y masa de cada una de las secuencias de oligonucleótidos empleadas. Temperatura melting (Tm). Porcentaje de nucleótidos GC en la secuencia. Dirección de la secuencia

| Variante I | Secuencia tras extensión I | Masa I | Variante I | Secuencia tras extensión II | Masa II |
|------------|----------------------------|--------|------------|-----------------------------|---------|
| A | TGTCGCTGCGCCAGCCCA | 5394,5 | G | TGTCGCTGCGCCAGCCCG | 5410,5 |
| C | ATGTTGCTGTCCAGGAGG | 5528,6 | A | ATGTTGCTGTCCAGGAGT | 5568,5 |
| C | GCTGAGTGGAGAGCAGTG | 5602,7 | A | GCTGAGTGGAGAGCAGTT | 5642,6 |
| G | CAGTCAGAGAGACCCCCG | 5725,8 | A | CAGTCAGAGAGACCCCCGT | 5805,7 |
| G | TCATGTGGGAAAAGAAATACC | 6445,3 | A | TCATGTGGGAAAAGAAATACT | 6525,2 |
| C | TCAATAGAAAAGAAACCTTCAG | 7015,6 | A | TCAATAGAAAAGAAACCTTCAT | 7055,5 |

Tabla 9. Secuencias y masas de los oligonucleótidos tras la reacción de extensión con cada una de las variantes de los SNP seleccionados.

3.3.3.2. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

Se lleva a cabo la reacción de amplificación en un volumen final de 5 μ L con el objetivo de obtener los fragmentos de ADN que comprenden los SNP seleccionados.

Los componentes de la reacción de amplificación así como las condiciones de la misma se detallan en las Tablas 10 y 11 respectivamente.

| Reactivos | Concentración en 5 μ L | Volumen (1 reacción) |
|--|----------------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | --- | 1'850 μ l |
| Buffer PCR con MgCl ₂ (10X) | 1'25 x | 0'625 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1'625 mM | 0'325 μ l |
| dNTPs (25 mM) | 500 μ M | 0'100 μ l |
| Oligonucleótidos (500 nM) | 100 nM | 1'000 μ l |
| ADN genómico (5-10 ng/ μ L) | 5-10 ng | 1'000 μ l |
| Hotstar Taq® (5 U/ μ L) | 0'5 U | 0'100 μ l |
| Total | | 5'000 μl |

Tabla 10. Composición de los reactivos de la reacción de amplificación

| | Temperatura | Tiempo | |
|---------------------------|-------------|--------|--------------------|
| Desnaturalización inicial | 94° C | 15' | |
| Desnaturalización | 94° C | 20" | } 45 ciclos |
| Hibridación | 56° C | 30" | |
| Extensión | 72° C | 1' | |
| Extensión final | 72° C | 3' | |

Las reacciones de amplificación se mantienen a 4°C hasta su utilización.

Tabla 11. Condiciones de amplificación por PCR

3.3.3.3. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

Con el objetivo de inactivar por desfosforilación los dNTPS que no hayan sido incorporados al nuevo segmento de ADN generado se realiza un tratamiento del producto resultante de la amplificación por PCR según se recoge en la Tabla 12, empleando para ello las propiedades enzimáticas de la Fosfatasa Alcalina de camarón (SAP).

| Reactivos | Volumen (1 reacción) |
|---------------------|----------------------|
| H ₂ O | 1'330 µl |
| Buffer SAP (10X) | 0'170 µl |
| Enzima SAP (1 U/µL) | 0'500 µl |
| Total | 2'000 µl |

Tabla 12. Composición de la reacción de purificación enzimática

Una vez concluida la mezcla de reacción en un volumen final de 2 µl, se añaden 5 µl del producto de PCR directamente a la misma y se incuba la dilución resultante a 37 °C durante 40 minutos para promover la desfosforilación de los nucleótidos. Posteriormente se incuba a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. El producto purificado se mantiene a 4 °C hasta su análisis posterior.

3.3.3.4. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE IPLEX® GOLD.

La reacción de discriminación alélica, *primer extensión* se realiza mediante el sistema de ensayo iPLEX® Gold. Este sistema se basa en la unión de un oligonucleótido a una región adyacente al SNP de interés que tras la adición de una ADN polimerasa más una mezcla de nucleótidos terminadores permite su extensión lo largo del sitio polimórfico generando un producto de extensión alelo-específico (Tabla 13). Estas reacciones terminan tras una extensión de una única base (*Single Base Extension* o SBE) en las que se utiliza terminadores modificadores de masa, que generan una diferencia de masa molecular en el producto de extensión (*Oeth y cols., 2007*).

| Reactivos | Concentración en 9 μ L | Volumen (1 reacción) |
|--|----------------------------|--------------------------------|
| H ₂ O | --- | 0'755 μ l |
| Buffer iPLEX Plus (10X) | 0'222 X | 0'200 μ l |
| Mezcla de terminadores iPLEX | 1 X | 0'200 μ l |
| Mezcla de oligonucleótidos (7 μ M: 14 μ M) | 0'625 uM | 0'804 μ l |
| Enzima iPLEX | 1'25 uM | 0'041 μ l |
| Total | 1 X | 2'000 μl |

Tabla 13. Composición de los reactivos de la reacción de amplificación

Se amplifican los fragmentos de ADN que contienen los SNP de interés mediante una PCR multiplex compuesta por 200 ciclos, donde se emplean los seis pares de oligonucleótidos en una única reacción con el fin de amplificar simultáneamente los segmentos de ADN seleccionados (Tabla 14).

| | Temperatura | Tiempo | |
|---------------------------|-------------|--------|--------------------------------------|
| Desnaturalización inicial | 94° C | 30" | |
| Desnaturalización | 94° C | 5" | } 5 ciclos } 40 ciclos |
| Hibridación | 52° C | 5" | |
| Extensión | 80° C | 5" | |
| Extensión final | 72° C | 3' | |

Las reacciones de amplificación se mantienen a 4°C hasta su resolución.

Tabla 14. Condiciones establecidas para realizar la amplificación en cadena de la polimerasa.

Para optimizar el análisis por espectrometría de masas diluimos el producto de la reacción iPLEX con 16 μ l de agua y le añadimos 6 mg de una resina proporcionada por Sequenom™. De este modo, la muestra es embebida en una matriz orgánica, la cual cristaliza en contacto con el aire y resulta esencial en la ionización posterior.

3.3.3.5. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los productos de dichas reacciones son transferidos de forma automatizada mediante un nanodispensador a la superficie de un SpectroCHIP® y a continuación se procesan en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight*)

Cualquier espectrómetro de masas tiene tres elementos principales: la fuente de ionización, el analizador y el detector.

El resultado de aplicar una fuente de ionización sobre una molécula es la formación de iones, generados por exceso o pérdida de electrones, por lo que dichas moléculas estarán cargadas eléctricamente. En el caso de MALDI-TOF, la fuente de ionización es un láser ultravioleta con longitud de onda de 337 nm, que produce la desorción e ionización de la muestra. El papel fundamental de la resina añadida previamente es absorber y, después, transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización. La energía del láser causa una desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de partículas. A estas partículas iónicas se les aplica un campo eléctrico, a través del cual son aceleradas debido a su carga adquiriendo una elevada energía cinética y son dirigidas a través de un tubo de vuelo hacia el analizador de masas.

El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/ carga (m/z). Este ratio determina el tiempo que tarda un ión en alcanzar el detector (tiempo de vuelo). La mayor parte de iones generados poseen una sola carga ($z = 1$), por lo que el ratio masa/ carga en realidad equivale a la masa molecular de los iones generados. Por tanto los iones más pequeños vuelan más rápido y alcanzan antes el detector, mientras que los de mayor masa tardan más. Finalmente, los iones impactan contra el detector, que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas en el que se representa las masas de los diferentes iones generados en función de la intensidad de la señal.

El análisis de la diferencia de masas se realiza con el programa informático MassARRAY® TYPER Analyzer 3.4 proporcionado por Sequenom™ y hace posible el genotipado de cada SNP.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se diseñó una base de datos utilizando la herramienta ofimática Excel (Microsoft Office 2007) que contempló todos los datos sociodemográficos (sexo, edad, estudios), clínicos y farmacológicos de los pacientes, así como sus hábitos de consumo y antecedentes familiares de adicción.

Una nueva base de datos que incluye los resultados del genotipado de cada uno de los siete SNP, (casos y controles) se elaboró y se procesó en el programa de análisis estadístico SPSS, versión 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los patrones electroforéticos de la variante TaqIA se registraron como datos nominales en homocigotos A_1/A_1 , heterocigotos A_1/A_2 y homocigotos A_2/A_2 . Los resultados del genotipado del resto de polimorfismos también se registraron como datos nominales. Una vez registrados todos los resultados en el programa estadístico se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo. Posteriormente se procedió al análisis de asociación utilizando el estadístico χ^2 , tras elaborar las tablas de contingencia correspondientes.

Los datos categóricos y las proporciones se procesaron mediante la prueba estadística de chi-cuadrado, comparando las diferencias encontradas entre casos y controles. Para las variables continuas, se calcularon las medias y las desviaciones estándar.

Para completar los análisis univariantes y proceder con el análisis multivariante, en el que se incluyen todos los polimorfismos a estudio, se utilizó el programa estadístico SNPStats (*Sole y cols., 2006*) que permite estimar las frecuencias de los haplotipos mediante el algoritmo esperanza-maximización (EM). Este algoritmo converge a valores estables de frecuencia de combinaciones de genotipos con incertidumbre y de frecuencias de haplotipos.

Los análisis univariantes se utilizaron para detectar variables que determinen una mayor predisposición a desarrollar dependencia a la cocaína. Los análisis multivariantes mediante modelos de regresión logística polinómica se destinaron en estimar la asociación de los haplotipos con la enfermedad. En todos estos análisis se calculan las correspondientes odds ratios (intervalos de confianza del 95%).

Todas las pruebas fueron de dos colas con valores de $p < 0,05$ que se consideraron significativos.

3.4.1. Análisis descriptivo de un polimorfismo

3.4.1.1. CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.

El primer paso para realizar una descripción estadística de un polimorfismo, consiste en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y genotipo posible, lo que en genética de poblaciones se conoce como cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas. El genotipo de cada individuo para un polimorfismo concreto se puede determinar mediante las técnicas de biología molecular disponibles en la actualidad. Por tanto, las frecuencias genotípicas de una muestra poblacional se calculan fácilmente a través de las proporciones registradas para cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas se establece como unidad observacional el cromosoma, entendiendo que cada individuo contribuye con dos cromosomas y por tanto duplicando el tamaño muestral, calculando entonces la proporción de cada alelo sobre el total de alelos aportados a la muestra por los individuos de la población. Los individuos homocigotos portan la misma variante polimórfica en los dos cromosomas. A cada posible variante se le denomina alelo, por tanto contribuyen con dos copias en el cálculo de la frecuencia de ese alelo específico. En cambio los individuos heterocigotos contribuyen en el cálculo de ambas frecuencias alélicas pero sólo con uno de sus alelos en cada caso.

3.4.1.2. DESCRIPCIÓN DINÁMICA DEL POLIMORFISMO. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

La descripción dinámica se refiere a la dimensión temporal e implica la predicción de la composición genética que define la población en un instante futuro en función de su situación inicial. Si la transmisión de los alelos en cada generación es independiente de factores externos y constante en el tiempo y no se encuentra distorsionada por fuerzas sistemáticas de cambio de las frecuencias alélicas como son la migración, deriva genética, mutación y selección natural, se considera que la población se ajusta al principio de equilibrio de Hardy-Weinberg, donde las frecuencias genotípicas se pueden expresar en función de las frecuencias alélicas. Esta es una condición ideal que necesariamente debe cumplir una población para emplear las pruebas estadísticas paramétricas. El ajuste a este modelo ideal, se comprueba mediante una prueba de χ^2 con un grado de libertad y es esencial para proceder al estudio estadístico de la asociación, pues una desviación del equilibrio en la muestra de controles (representantes de la población general) podría invalidar el análisis por un fallo en el diseño o método de estudio.

Para realizar este contraste, se disponen los datos en una tabla de frecuencias. Para cada valor o intervalo de valores se indica la frecuencia absoluta o empírica (O_i). A continuación, y suponiendo que la hipótesis nula es cierta, se calculan para cada valor o intervalo de valores la frecuencia absoluta que cabría esperar o frecuencia esperada ($E_i = n \cdot p_i$, donde n es el tamaño de la muestra y p_i la probabilidad del i -ésimo valor o intervalo de valores según la hipótesis nula). El estadístico de prueba se basa en las diferencias entre la O_i y E_i .

$$\chi^2 = \sum (O_i - E_i)^2 / E_i$$

Si existe concordancia perfecta entre las frecuencias observadas y las esperadas, el estadístico tomará un valor igual a 0 y se acepta que la población se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg; por el contrario, si existe una gran discrepancia entre estas frecuencias el estadístico tomará un valor grande y se rechazará la condición ideal. Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si la muestra poblacional se ajusta a este modelo, en caso de que se observe una desviación del equilibrio debe revisarse el método de genotipado y descartar cualquier sesgo por interpretación de resultados.

3.4.2. Análisis de asociación

Para evaluar si existe una predisposición genética significativa entre una de las dos variantes de los polimorfismos seleccionados y el consumo o dependencia a la cocaína y tras comprobar que la muestra poblacional a estudio reúne las condiciones ideales de equilibrio, se construye la tabla de contingencia correspondiente y se procede a contrastar la hipótesis de asociación utilizando el estadístico χ^2 , mencionado en el apartado anterior. En esta prueba se contrastan las frecuencias genotípicas obtenidas en el grupo de casos frente a las del grupo control, para valorar si las diferencias observadas son producto del azar o se deben a una asociación estadística entre ambas variables cualitativas.

Para ello se establecen dos hipótesis de partida:

$$H_0 = P_1 = P_2 \text{ o } P_1 - P_2 = 0$$

$$H_1 = P_1 \neq P_2 \text{ o } P_1 - P_2 \neq 0$$

Donde, P_1 = frecuencias genotípicas en la muestra de controles

P_2 = frecuencias genotípicas en la muestra de casos

El número de grados de libertad (gl) utilizado en el análisis estadístico se calcula a partir del número de columnas y filas de la tabla de contingencia: $gl = (n^\circ \text{ filas} - 1) (n^\circ \text{ columnas} - 1)$

Para cuantificar la magnitud de la asociación, se calcularon las odds ratios (OR) de cada genotipo respecto al genotipo de referencia y los correspondientes intervalos de confianza (CI) del 95%

A menudo existen variables que pueden modificar el riesgo de la enfermedad de interés. En estos casos es preferible emplear modelos de regresión logística por su versatilidad. El modelo logístico se define por la ecuación:

$$\text{Log} [p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

Donde α, β, γ son parámetros estimados

P = probabilidad de ser caso

G = genotipo del polimorfismo

Z = variable de ajuste

En ocasiones resulta difícil establecer el modelo de herencia más adecuado para cada polimorfismo. Por lo general se compara el ajuste de cada modelo de herencia con el modelo codominante por ser el más habitual. Para ello se utiliza el test de la razón de verosimilitudes. (LR)

$$LR = 2 * (\ln L1 - \ln L2)$$

Cuando aun así, no sea posible diferenciar entre varios modelos, se recurre al criterio de información de Akaike (AIC) y se selecciona como óptimo el modelo con el menor valor de AIC.

$$AIC = -2\log[L] + 2\#\text{parámetros}$$

3.5. ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE MÚLTIPLES SNP

Las diferencias observadas entre las distintas etnias son producto de la diversidad genéticas, sin embargo, evolutivamente todos los humanos partimos de un ancestro común y por lo tanto compartimos regiones cromosómicas con el resto de nuestros contemporáneos, de tal manera que, los loci que están ligados en esos segmentos constituyen haplotipos que confluyen en asociaciones poblacionales entre los alelos relevantes.

El proyecto internacional HapMap aspira a definir los bloques de haplotipos conservados a través de varios grupos étnicos y ha confirmado que el mapa cromosómico se define como un mosaico de bloques ancestrales que constituyen entidades estadísticas que deben ser analizadas como tal, al que se suman regiones dispersas coincidentes con zonas de alta recombinación o conversión génica.

La asociación alélica debida a segmentos cromosómicos ancestrales compartidos es lo que se denomina desequilibrio de ligamiento. Nos orienta sobre el grado de conservación evolutiva de una determinada región del cromosoma. Con frecuencia, son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en una región candidata, porque se desconoce la variante genética concreta responsable de la enfermedad.

Los SNP que comparten un mismo bloque genético se comportan como una unidad estadística. La probabilidad de que entre dos SNP próximos se origine un sobrecruzamiento es más baja cuanto más cercanos se encuentren entre si y por tanto el desequilibrio de ligamiento o dependencia estadística será mayor. El desequilibrio de ligamiento es muy útil, porque permite identificar el conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente y localizar regiones y polimorfismos relacionados con la enfermedad, de este modo resulta más fácil identificar y localizar el polimorfismo causal de la enfermedad.

Para determinar el grado de desequilibrio de ligamiento entre los SNP seleccionados, se calcula el estadístico D como desviación entre la frecuencia haplotípica esperada en caso de no existir asociación y la frecuencia observada. Siendo p_1 y p_2 las probabilidades de dos alelos, y p_{12} la probabilidad observada de la pareja: $D = p_{12} - p_1 p_2$

Los resultados de este estadístico pueden manejar fácilmente si se le aplica una escala logarítmica, utilizando indistintamente el estadístico D' igual al anterior pero en escala $[-1,1]$. Cuanto más se aproxime el valor de este estadístico al 0, menor desequilibrio de ligamiento.

El coeficiente de correlación entre alelos (r) también se utiliza para determinar el grado de desequilibrio de ligamiento. Sus valores se sitúan entre $[-1,1]$, aumentando la relación lineal hacia los extremos del intervalo y, como en el caso anterior cuanto más se acerca al 0, menor la dependencia entre alelos.

Identificar los haplotipos de cada individuo a partir de los genotipos de cada SNP no es siempre tarea fácil. Un individuo es portador de una pareja de haplotipos, uno por cada cromosoma. Cuando se realiza un estudio simultáneo de varios SNP se obtiene una serie de combinaciones que frecuentemente dificulta el cálculo de las frecuencias de los haplotipos, como ocurre en individuos con dos o más SNP heterocigotos donde no se puede identificar los haplotipos que conforman cada cromosoma. Para resolver este problema, se recurre a métodos de estimación que tienen en cuenta variables con incertidumbre para resolver este problema.

En este caso concreto se realiza la estimación estadística de las frecuencias utilizando el algoritmo esperanza-maximización (EM). En primer lugar, se usan unas frecuencias iniciales, no necesariamente correctas, para cada posible haplotipo. En el supuesto de que esas frecuencias fuesen correctas, y asumiendo que hay equilibrio de Hardy-Weinberg, se podría calcular la frecuencia esperada de cada combinación de genotipos con incertidumbre. Con las frecuencias de cada combinación de genotipos se pueden obtener las frecuencias de cada haplotipo maximizando la función de verosimilitud de los haplotipos. Este paso consiste en contar los haplotipos compatibles con cada combinación de genotipos. El algoritmo converge a valores estables de frecuencia e combinaciones de genotipos con incertidumbre y de frecuencia de haplotipos, que es nuestro objetivo (*Iniesta y cols., 2005*).

Una vez estimada la pareja de haplotipos en cada individuo en función del genotipo de sus SNP puede analizarse la asociación con la enfermedad recurriendo a métodos de regresión logística en los que cada individuo contribuye con dos observaciones, una para cada haplotipo; comparando el riesgo asociado con los diversos haplotipos entre sí y tomando como referencia el más frecuente.

3.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Para predecir las consecuencias que las variantes genéticas que conllevan cambio de aminoácido, pueden tener sobre la estructura y función de las proteínas, y consecuentemente sobre el fenotipo molecular, se utilizan programas informáticos diseñados para analizar distintas variables como pueden ser, la conservación evolutiva, los cambios en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos sustituidos, el entorno de la secuencia de un aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de las proteínas. Entre los programas disponibles hay cada vez más alternativas y cada uno de ellos se caracteriza por emplear un método de predicción diferente, probablemente el más universal de todos sea SIFT (*Kumar y cols., 2009*), que usa como evidencia la historia evolutiva de cada familia de proteínas e integra información estructural o PolyPhen-2 (*Adzhubei y cols., 2010*).

Las variantes sinónimas no alteran la secuencia de aminoácidos que conforman la proteína, sin embargo pueden modificar los sitios consenso de unión de las proteínas ricas en Serina y Arginina (proteínas SR) y perturbar la unión de éstas a los sitios ESE (sitios exónicos de potenciación del procesamiento). Para estudiar las consecuencias que pueden tener estas variantes utilizamos el programa de predicción ESE Finder (*Cartegni y cols., 2003; Smith y cols., 2006*).

3.6.1. Análisis posible patogenicidad de las mutaciones

3.6.1.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA CONSERVACIÓN

SIFT (*Sorting intoleran from tolerant*) (<http://sift.jcvi.org>)

Este programa informático recurre a una combinación de variables para analizar el efecto que tiene la sustitución de un determinado aminoácido sobre la función de la proteína y comprobar si este cambio puede alterar el fenotipo molecular de la misma (*Ng y Henikoff, 2003*). Por un lado analiza la correlación existente entre secuencias similares a la de interés, recogidas en las bases de datos. Esta búsqueda se realiza a través de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en su versión para proteínas. De entre todas las secuencias, selecciona aquellas que comparten un mayor grado de homología. Sobre éstas se aplican múltiples alineamientos de información y posteriormente se calculan las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. En general una

posición altamente conservada en el alineamiento no tolera bien las sustituciones en la secuencia aminoacídica, mientras que una posición no conservada en el alineamiento puede tolerar mejor los cambios de aminoácido (*Ng y Henikoff, 2001*). De este modo, las sustituciones que arrojen probabilidades menores a 0.05 serán clasificadas como deletéreas, mientras aquellas con un valor mayor o igual a 0.05 son catalogadas como toleradas o neutrales. Es importante señalar que la precisión de las predicciones dependerá del alineamiento que se obtenga en cada caso.

3.6.1.2. MÉTODOS BAYESIANOS

PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Este programa predice el significado funcional de una sustitución aminoacídica. Para ello, integra un primer análisis profundo de la secuencia, donde se identifica y localiza la sustitución, y posteriormente de la estructura, donde se contemplan algunas de las características más importantes de la proteína para obtener los resultados finales. La predicción realizada se sustenta en reglas empíricas que incluyen consideraciones físicas y comparativas de la sustitución (*Nakken y col., 2007*). Para ello, hace uso de un clasificador probabilístico Naive Bayes que se sirve de dos pares de conjuntos de datos. Por una parte recurre a la colección de datos HumDiv, que incluye los alelos perjudiciales causantes de enfermedades humanas extrapolados desde UniProtKB, y amplía su información con las diferencias entre las proteínas humanas y sus homólogas más cercanas. Por otra, integra datos de HumVar, que suma a las mutaciones causantes de patología humana de la base de datos UniProtKB, el conjunto de nsSNP, sin patología asociada.

Como en el caso anterior, una vez introducida la secuencia de interés, se lleva a cabo la alineación múltiple con las secuencias homólogas. No obstante, el resultado es empleado para calcular una matriz del perfil con el programa PSIC (*Position-Specific Independent Counts*). Los elementos de la matriz son ratios logarítmicos que contrastan la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que ese aminoácido se localice en cualquier otra posición. El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los ratios de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Los resultados del análisis denotan cuatro posibilidades en cuanto al significado de la variante:

- Probablemente patogénica: alta probabilidad de que la función o estructura de la proteína resulte alterada.
- Posiblemente patogénica: la función o estructura de la proteína podría estar alterada
- Benigna: probablemente carece de efecto fenotípico.
- Significado incierto: no existen datos suficientes para reliazar una predicción

Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>)

Esta herramienta informática despunta una importante diferencia con respecto a los algoritmos ya descritos, y es que permite un análisis más amplio de las variantes de ADN, pues además de aquellas que conllevan un cambio de aminoácido asociado, también admite el estudio de variantes sinónimas, intrónicas o complejas como pequeñas inserciones. Los modelos de predicción difieren según el tipo de variante a analizar y en todos los casos se emplea un clasificador Naive Bayes muy sofisticado, pues los datos son recopilados de varias fuentes. La selección de SNP se hace a través de dbSNP en base a las frecuencias de la población en HapMap y constituye la base de datos de variantes neutras.

3.6.2. Análisis de sitios ESE

El procesamiento correcto de los intrones es un proceso complejo imprescindible para la síntesis de una proteína, en el que interviene un complejo riboproteico que reconocerá y se unirá al ARNm guiado por las señales presentes en el sitio 5' (donador), el sitio 3' (aceptor) y el sitio de ramificación (*Dhir y cols., 2010*). Estas señales interactúan con el complejo y delimitan la secuencia entre el exón y el intrón estableciendo los puntos de corte para eliminar las secuencias no codificantes en el ARNm maduro. Existen a lo largo del ARNm otro tipo de señales que regulan el mecanismo de procesamiento, favoreciendo la inclusión del exón en el ARNm maduro y ejerciendo su función vinculada a la de las proteínas SR para generar señales positivas o potenciadoras y pueden estar presentes tanto en el exón (ESE) como en el intrón (ISE). Por el contrario, si estas secuencias promueven la exclusión de los exones del ARNm maduro actúan como silenciadoras (ESS y ISS) a través de la incorporación de las ribonucleoproteínas hnRNP (*Ohno y Masuda, 2011*).

El cambio de nucleótido promovido por un polimorfismo podría alterar alguna de estas señales y consecuentemente intervenir en el mecanismo postranscripcional del ARNm. Por ello, el estudio de las variantes sinónimas e intrónicas se realiza de manera diferente. Al no tener una repercusión directa sobre la secuencia de aminoácidos, es imposible desarrollar estudios de conservación entre especies o de alteración de estructura y función proteicas, tan solo se pueden realizar predicciones sobre la posible disrupción de las señales potenciadoras y silenciadoras.

ESE Finder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>)

El procesamiento del ARNm requiere una maquinaria específica de ribonucleoproteínas (snRNPs) y ARN pequeño nuclear (ARNnp) formando un complejo macromolecular conocido como espliceosoma que se ensambla alrededor del ARNm tras reconocer determinadas secuencias intrónicas y exónicas.

- Sitio 5' o donador.
- Sitio 3' o aceptor.
- Punto de ramificación (BR) localizado de 14 a 50 nucleótidos del sitio 3'.
- Tracto de polipirimidinas localizado entre el punto de ramificación y el sitio 3'

Además existen otras secuencias en el ARNm que corresponden a lugares de unión de distintos elementos que intervienen en dicho proceso como reguladores. Se clasifican según su función y su posición en:

- ESE (secuencia exónica potenciadora).
- ESS (secuencia exónica silenciadora).
- ISE (secuencia intrónica potenciadora).
- ISS (secuencia intrónica silenciadora).

Estos factores reguladores se unen a las secuencias descritas fomentando la inclusión o exclusión de exones. Entre los elementos reguladores destacan las proteínas SR que se unen a las secuencias ESE del ARNm, promueven las etapas iniciales del procesamiento y se comportan como potenciadores del proceso. Las interacciones y equilibrios entre elementos reguladores suponen un punto crítico en el procesamiento del ARNm.

Esta herramienta informática, permite analizar el efecto que puede provocar el cambio de nucleótido sobre los sitios consenso de unión de proteínas SR (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55). Por tanto predice la posibilidad de que el cambio desarrolle su función como disruptor de elementos cis. Para ello, se efectúa una comparación entre la secuencia normal y la modificada. El programa valora la presencia de sitios ESE que puede provocar el cambio de nucleótido en ambas secuencia y considera significativos los cambios exónicos que hacen que desaparezca algún sitio ESE.

Para cada una de las proteínas SR, se establece un valor umbral, como el mínimo para que una secuencia determinada se considere significativa para la unión de alguna de las proteínas de procesamiento.

| SNP | GEN | Localización | Posición | Alelos | MAF | Aminoácido | Modificación en proteína |
|------------|--------------|--------------|-----------|--------|------|------------|--------------------------|
| rs584427 | <i>NCAM1</i> | Exon 12 | 112609206 | A/C | 0,33 | Val540= | Sin cambio |
| rs723077 | <i>TTC12</i> | Exon 3 | 112699378 | A/C | 0,36 | Met73Leu | Azufrado/Alifático |
| rs2303380 | <i>TTC12</i> | Intron 7 | 112705919 | A/G | 0,39 | --- | --- |
| rs4938012 | <i>ANKK1</i> | Intron 1 | 11276864 | G/A | 0,34 | --- | --- |
| rs4938013 | <i>ANKK1</i> | Exon 2 | 112769680 | C/A | 0,34 | Ile151= | Sin cambio |
| rs11604671 | <i>ANKK1</i> | Exon 6 | 112773269 | G/A | 0,23 | Gly318Arg | Hidrofóbico /Hidrofílico |
| rs1800497 | <i>ANKK1</i> | Exon 8 | 112776038 | G/A | 0,33 | Glu713Lys | Ácido/Básico |

Tabla 15. Polimorfismos seleccionados y sus características. El segundo alelo se corresponde con la variante alélica menos frecuente (MAF), seguida de su frecuencia según la base de datos 1000 Genomes.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO. DISTRIBUCIÓN POR EDAD Y SEXO

El estudio epidemiológico realizado es un estudio caso-control, donde el grupo a estudio está formado por 100 pacientes dependientes a la cocaína que son comparados con un grupo control compuesto por 85 donantes anónimos que no presentan ningún tipo de dependencia a las drogas de abuso.

Para definir poblacionalmente los dos grupos y establecer si existen diferencias importantes que puedan dar lugar a posibles sesgos en el análisis posterior, se compara la distribución por edad y sexo de cada uno de ellos.

A partir de la distribución de la variable cuantitativa continua, se calcula como parámetro de centralización, la media aritmética y como parámetros de posición, los percentiles (Tabla 16). La edad media de consumo de cocaína en los pacientes seleccionados se sitúa en los 35.25 años, muy semejante a la mediana (P50) igual a 33 años, por lo que la variable edad sigue una distribución bastante simétrica. El 75% de los pacientes tienen una edad inferior a los 40 años y el 90% tiene una edad inferior a 48 años. Estos rangos de edad sitúan el mayor grado de consumo de cocaína en la cuarta década de la vida.

Para comparar las medias de edad de ambos grupos, previamente y puesto que el tamaño muestral es suficientemente grande ($n \geq 30$), se asume que la variable cuantitativa sigue una distribución aproximadamente normal dentro de cada grupo. Paralelamente se comprueba la igualdad de varianzas (homocedasticidad) utilizando la prueba de Levene ($F= 10.14$, $p= 0.002$), puesto que el p-valor correspondiente a esta prueba es inferior a 0.05, se asume que las varianzas son significativamente distintas y por tanto corresponde aplicar la prueba de Welch para comparar las medias, que resulta en un valor para el estadístico $t = 3.42$ y $p= 0.001$. La diferencia de medias observada es de 5.26 con un intervalo de confianza al 95% entre 2.29 y 8.22, por tanto existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad en ambos grupos, siendo superior la media de edad en el grupo control.

RESULTADOS

Paralelamente, se calculan los porcentajes de la variable categórica sexo en ambos grupos (Tabla 17). Destaca un mayor porcentaje de hombres (77%) frente a las mujeres (23%) entre los adictos a la cocaína (Figura 9.B). Aplicando la prueba estadística para comparar proporciones, tenemos un valor de $X^2 = 29.16$ que, con 1 grado de libertad, le corresponde un valor $p < 0.05$. Se considera estadísticamente significativa y se puede afirmar que la muestra procede de una población donde la proporción de hombres es superior a la de mujeres. Los porcentajes se distribuyen de un modo semejante en el grupo control (Figura 9.A) predominando el número de hombres frente al de las mujeres ($X^2 = 7.353$, $p = 0.007$).

| Grupo | Media | 0.05 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 0.9 | 0.95 |
|-----------|-------|------|-----|------|-----|------|------|-------|
| Controles | 40.51 | 24.2 | 25 | 32 | 40 | 49 | 55.6 | 59.6 |
| Casos | 35.25 | 23 | 25 | 28 | 33 | 40 | 48 | 52.05 |

Tabla 16. Covariable edad. Se calcula como medida de centralización la media y como medida de posición los percentiles.

| Grupo | Tamaño muestral | Hombres | Mujeres |
|-----------|-----------------|-----------|----------|
| Controles | 85 | 55 (65%) | 30 (35%) |
| Casos | 100 | 77 (77%) | 23 (23%) |
| Total | 185 | 132 (71%) | 53 (29%) |

Tabla 17. Covariable sexo. Se detalla la distribución por sexos en el grupo de casos y controles.

Centrándonos en el grupo de pacientes y utilizando los datos recogidos en las encuestas realizadas durante las entrevistas, se han definido una serie de variables de clasificación que han permitido establecer un perfil de paciente en la muestra a estudio.

En cuanto al estado civil, una mayoría de los pacientes son solteros, siguiéndole muy de cerca aquellos que comparten su vida en pareja. Solo un 16% de los pacientes se declara divorciado o separado. (Figura 10.A)

El grado de formación máxima que tienen estos pacientes se sitúa mayoritariamente en un nivel de estudios primarios (42%). El 22% de los pacientes abandonan sus estudios tras la educación secundaria y un porcentaje importante (31%) orienta sus estudios hacia la formación profesional. El grupo menos representado es el que alcanza estudios universitarios (5%) (Figura 10.B)

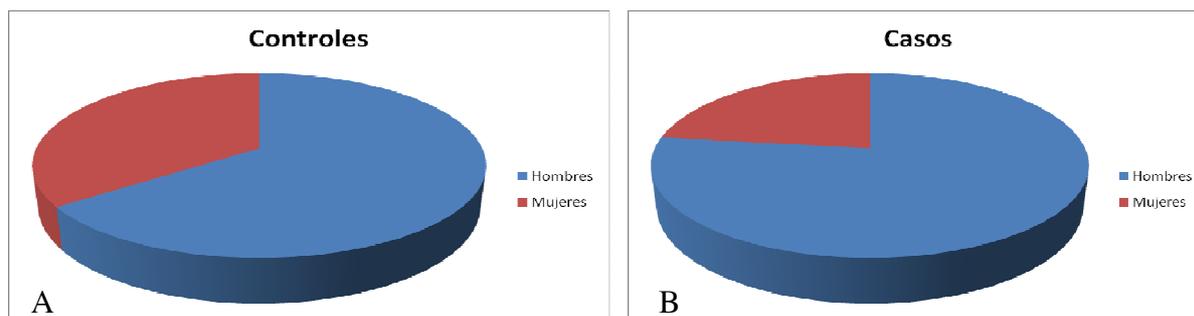


Figura 9. Representación gráfica de la distribución por sexos A) Controles. B) Casos

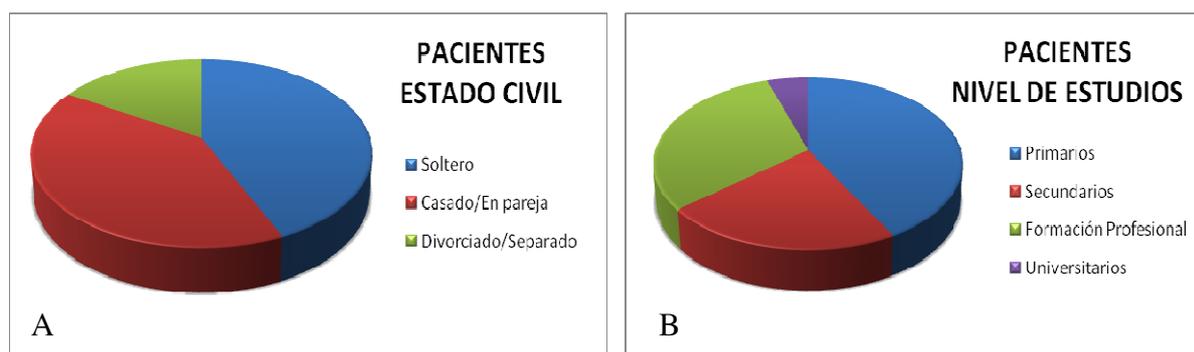


Figura 10. Características sociales de los pacientes. A) Estado Civil B) Estudios

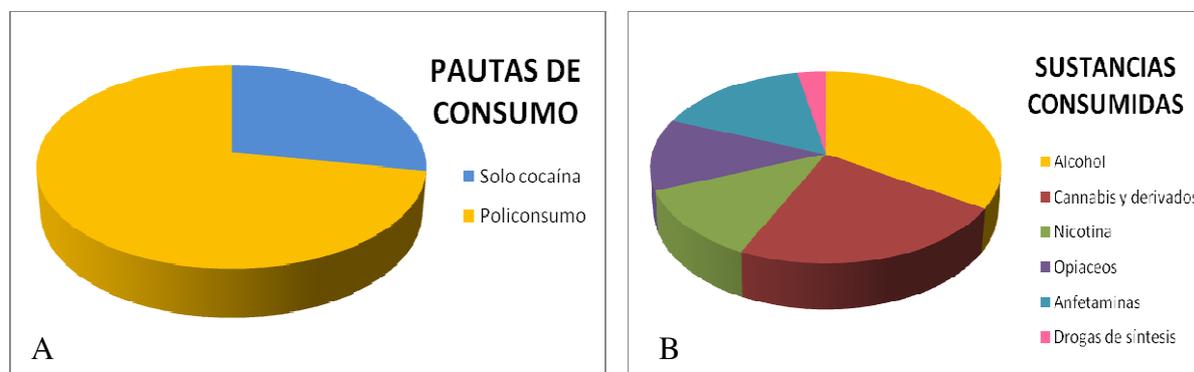


Figura 11. Pautas de consumo y principales sustancias combinadas con la cocaína.

En cuanto a pautas de consumo, 28% de los pacientes encuestados declara consumir únicamente cocaína. Sin embargo, el mayor porcentaje de los pacientes que participan en el estudio (72%) consumen además otras drogas (Figura 11.A). Dentro de éstas, la más consumida es el alcohol en un 34% de los casos, seguida muy de cerca por el cannabis y derivados en un porcentaje del 23% y las anfetaminas con un 16%. Nicotina y opiáceos registran unos porcentajes menores, pero no por ello despreciables y se combinan con la cocaína en el 12% de los casos. El menor porcentaje (3%) de las prácticas de consumo asociadas a cocaína corresponde con drogas de síntesis que en todos los casos se combina con el consumo simultáneo de varias drogas (Figura 11.B).

4.2. ANÁLISIS INDIVIDUAL DEL POLIMORFISMO RS1800497

4.2.1. Genotipado en gel de agarosa tras PCR y escisión enzimática

La variación de nucleótido del polimorfismo rs1800497 genera una diana de acción para la enzima de restricción TaqI. Esta característica ha sido utilizada para el genotipado del SNP en cada muestra. Una vez amplificada la región que contiene el polimorfismo en cuestión, la enzima TaqI reconoce la citosina y los nucleótidos flanqueantes y corta el material genético por ese punto, generando dos fragmentos de ADN. Sin embargo cuando en lugar de una citosina, el nucleótido en la secuencia es una timina, la enzima no reconoce su diana y no efectúa corte alguno manteniéndose el fragmento tal cual se ha amplificado. Esta diferencia en cuanto al reconocimiento de la enzima permite la discriminación de ambos alelos a través del tamaño de los fragmentos generados y consecuentemente el genotipado del polimorfismo en cada muestra del grupo control (Imagen 1) y del grupo de pacientes (Imagen 2).

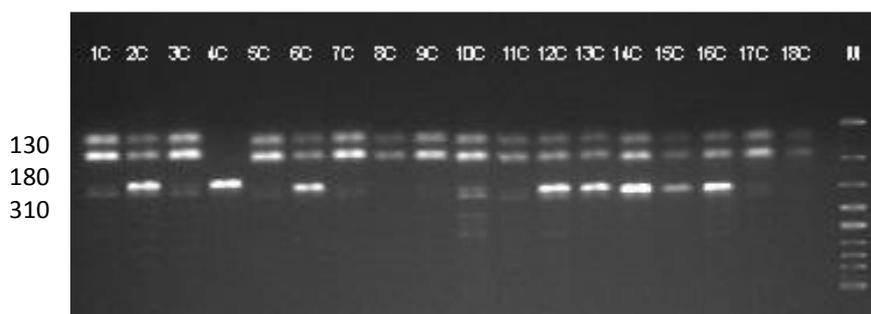


Imagen 1. Polimorfismo TaqIA resultado de la digestión con TaqI de las muestras del grupo control. C: control, M: marcador 100 pb



Imagen 2. Polimorfismo TaqIA resultado de la digestión con TaqI de las muestras obtenidas del grupo de pacientes dependientes a cocaína. P: paciente, M: marcador 100 pb

El genotipo heterocigoto A_1/A_2 se revela como tres fragmentos de 310 pb, 180 pb y 130 pb; el genotipo homocigoto A_2/A_2 como dos fragmentos de 180 y 130 pb; y el genotipo homocigoto A_1/A_1 se caracteriza por un único fragmento no escindido de 310 pb.

4.2.2. Descripción estadística del polimorfismo

El estudio estadístico incluye un análisis descriptivo del polimorfismo rs1800497 y el posterior análisis de asociación.

4.2.2.1. CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.

El análisis descriptivo del polimorfismo rs1800497, se detalla a continuación con la estimación de las frecuencias alélicas (Tabla 18) y genotípicas (Tabla 19)

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|----------------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A ₂ | 247 | 0.67 | 124 | p= 0.73 | 123 | p= 0.62 |
| A ₁ | 123 | 0.33 | 46 | q= 0.27 | 77 | q= 0.38 |

Tabla 18. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs1800497

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|--------------------------------|----------|------------|-----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A ₂ /A ₂ | 82 | 0.44 | 43 | p ² = 0.51 | 39 | p ² = 0.39 |
| A ₁ /A ₂ | 83 | 0.45 | 38 | 2pq= 0.45 | 45 | 2pq= 0.45 |
| A ₁ /A ₁ | 20 | 0.11 | 4 | q ² = 0.05 | 16 | q ² = 0.16 |

Tabla 19. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs1800497

En el grupo control se representan los tres genotipos con distinta frecuencia, A₂/A₂ (p² = 0.51), A₁/A₂ (2pq=0.45) y A₁/A₁ (q²=0.05). Esta distribución del genotipo no se desvía del equilibrio de Hardy-Weinberg pues la prueba de Chi-cuadrado que compara las frecuencias observadas y las esperadas en situación de equilibrio resulta en un p-valor = 0.28 (p > 0.05)

Para calcular las frecuencias alélicas, es necesario tener en cuenta que los sujetos portadores del alelo A₁, pueden llevarlo tanto en dosis única, caso de los individuos heterocigotos, como en doble dosis, caso de los homocigotos A₁/A₁ y lo mismo ocurre para el alelo A₂. Por tanto, se multiplicó por dos la aportación alélica de los homocigotos y se contaron 46 sujetos portadores del alelo (0.27) y 124 homocigotos del alelo A₂ (0.73).

RESULTADOS

El alelo A_1 es el menos frecuente en la población (0.33) y las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio concuerdan con las descritas en las bases de datos.

Tras analizar el grupo de pacientes dependientes, se observaron los tres genotipos con frecuencias diferentes a las descritas para el grupo control, A_2/A_2 ($p^2 = 0.39$), A_1/A_2 ($2pq=0.45$) y A_1/A_1 ($q^2=0.16$). Esta distribución del genotipo no se desvía del equilibrio de Hardy-Weinberg, la prueba de Chi-cuadrado que compara las frecuencias observadas y las esperadas en situación de equilibrio resulta en un p-valor = 0.67 ($p > 0.05$). Los pacientes portadores del alelo A_1 fueron genotipados como A_1/A_1 y A_1/A_2 y los portadores del alelo A_2 fueron clasificados como A_2/A_2 y A_1/A_2 . Por tanto, se contaron 77 sujetos con alelo A_1 (0.38) y 123 (0.62) con alelo A_2 .

Es destacable por tanto que la frecuencia del alelo A_1 es casi un 12% superior en el grupo formado por los pacientes, desviación a favor de los homocigotos A_1/A_1 que acumulan una frecuencia del 16% frente a la del 4% descrita en el grupo control. La frecuencia de los heterocigotos se mantiene constante en los dos grupos y constituye el genotipo con mayor número de representantes entre los pacientes, mientras que la frecuencia de los homocigotos A_2/A_2 disminuye considerablemente en este grupo (Figura 12).

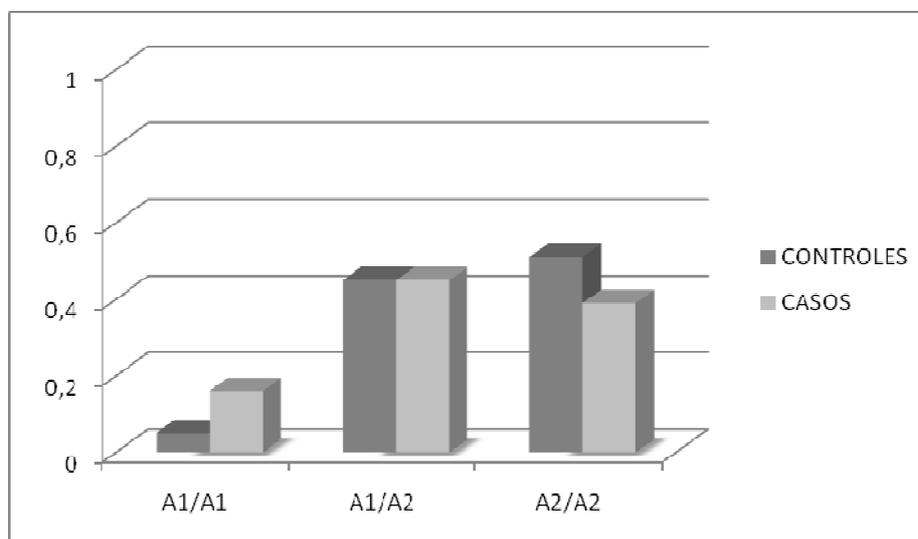


Figura 12. Frecuencias genotípicas relativas en casos y controles

4.2.2.2. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Como paso previo al análisis, se elabora la tabla de contingencia correspondiente (Tabla 20). Son tablas de doble entrada donde se realiza una clasificación de los datos de acuerdo a un doble criterio de clasificación. Con estas tablas se puede obtener una descripción de variables cualitativas (X e Y), en forma de frecuencias y porcentajes.

Además, se puede estudiar si existe asociación entre dos variables cualitativas mediante el estadístico Chi-cuadrado (Tabla 21).

- Tabla de contingencia

| GEN ANKK1 | TAQIA | | | Total |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| | A ₂ /A ₂ | A ₁ /A ₂ | A ₁ /A ₁ | |
| Pacientes | 39 | 45 | 16 | 100 |
| Controles | 43 | 38 | 4 | 85 |
| Total | 82 | 83 | 20 | 185 |

Tabla 20. Tabla de contingencia del polimorfismo rs1800497

- Prueba de Chi-cuadrado

Para evaluar la asociación estadística entre el polimorfismo rs1800497 y el desarrollo de dependencia a la cocaína, los datos almacenados fueron procesados en el programa estadístico SPSS. Los resultados de la prueba de Chi-cuadrado, arrojaron un valor del estadístico igual a 6.814

Una vez alcanzado el valor del estadístico, el siguiente paso consiste en evaluar si el valor que toma el estadístico es significativo. Para ello, se utiliza la tabla de distribución probabilística de χ^2 , la cual es dependiente de los grados de libertad. Como en este caso el número de genotipos analizados (n) es 3, el número de grados de libertad es igual a 2 (n-1).

Al definir previamente el error tipo I en $\alpha = 0.05$, se asume un 5% de error al aceptar como positivo un valor del estadístico igual a 5.9915 o superior. En este caso el valor del estadístico $\chi^2_{2\text{ gl}} = 6.814$ es mayor al teórico, por tanto se rechaza la hipótesis nula de igualdad de frecuencias y

RESULTADOS

se determina que las diferencias observadas entre los dos grupos son estadísticamente significativas y derivadas de una asociación entre el genotipo del marcador y la dependencia a cocaína.

El p-valor derivado del análisis es igual a 0.033, por tanto existe una probabilidad de 3.3% de descartar la hipótesis nula cuando en realidad es correcta, error que a priori estamos dispuestos a asumir (Tabla 21). No obstante, el modelo de herencia que mejor se ajusta a esta condición es el recesivo con un p-valor igual a 0.01 (Tabla 22).

| | Valor | Gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|--------------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 6.814 | 2 | 0.033 |

Tabla 21. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para el polimorfismo rs1800497.

| Modelo | Genotipo | Controles | Casos | OR (95% CI) | p-valor | AIC |
|--------------------|---|------------|----------|--------------------------|---------|-------|
| Codominante | A ₂ /A ₂ | 43 (50.6%) | 39 (39%) | 1.00 | 0.026 | 254.8 |
| | A ₁ /A ₂ | 38 (44.7%) | 45 (45%) | 1.31 (0.71-2.41) | | |
| | A ₁ /A ₁ | 4 (4.7%) | 16 (16%) | 4.41 (1.36-14.33) | | |
| Dominante | A ₂ /A ₂ | 43 (50.6%) | 39 (39%) | 1.00 | 0.11 | 259.1 |
| | A ₁ /A ₂ - A ₁ /A ₁ | 42 (49.4%) | 61 (61%) | 1.60 (0.89-2.87) | | |
| Recesivo | A ₂ /A ₂ - A ₁ /A ₂ | 81 (95.3%) | 84 (84%) | 1.00 | 0.01 | 253 |
| | A ₁ /A ₁ | 4 (4.7%) | 16 (16%) | 3.86 (1.24-12.03) | | |

Tabla 22. Análisis de asociación para el polimorfismo rs1800497 según los modelos de herencia

4.3. ESTUDIO DE SNP EN LA REGIÓN NTAD

4.3.1. Genotipado de marcadores por espectrometría de masas

El genotipo de las 185 muestras procesadas para los 6 SNP se representa en los diagramas de dispersión obtenidos mediante el programa informático MassARRAY® proporcionado por Sequenom™ para controles (Figura 13) y para pacientes (Figura 14). En las representaciones gráficas se distinguen fácilmente tres grupos que corresponden a los tres genotipos posibles para cada SNP. Además de incluir en el análisis muestras replicadas que confirman una correcta clasificación en los grupos, se ha incluido un trío de muestras Coriell como control de calidad: Na10830, Na10831 y Na12147. El genotipo heterocigoto es el más frecuente en el conjunto total de muestras analizadas para la mayoría de los SNP, excepto para rs2303380, rs4938012 y rs4938013

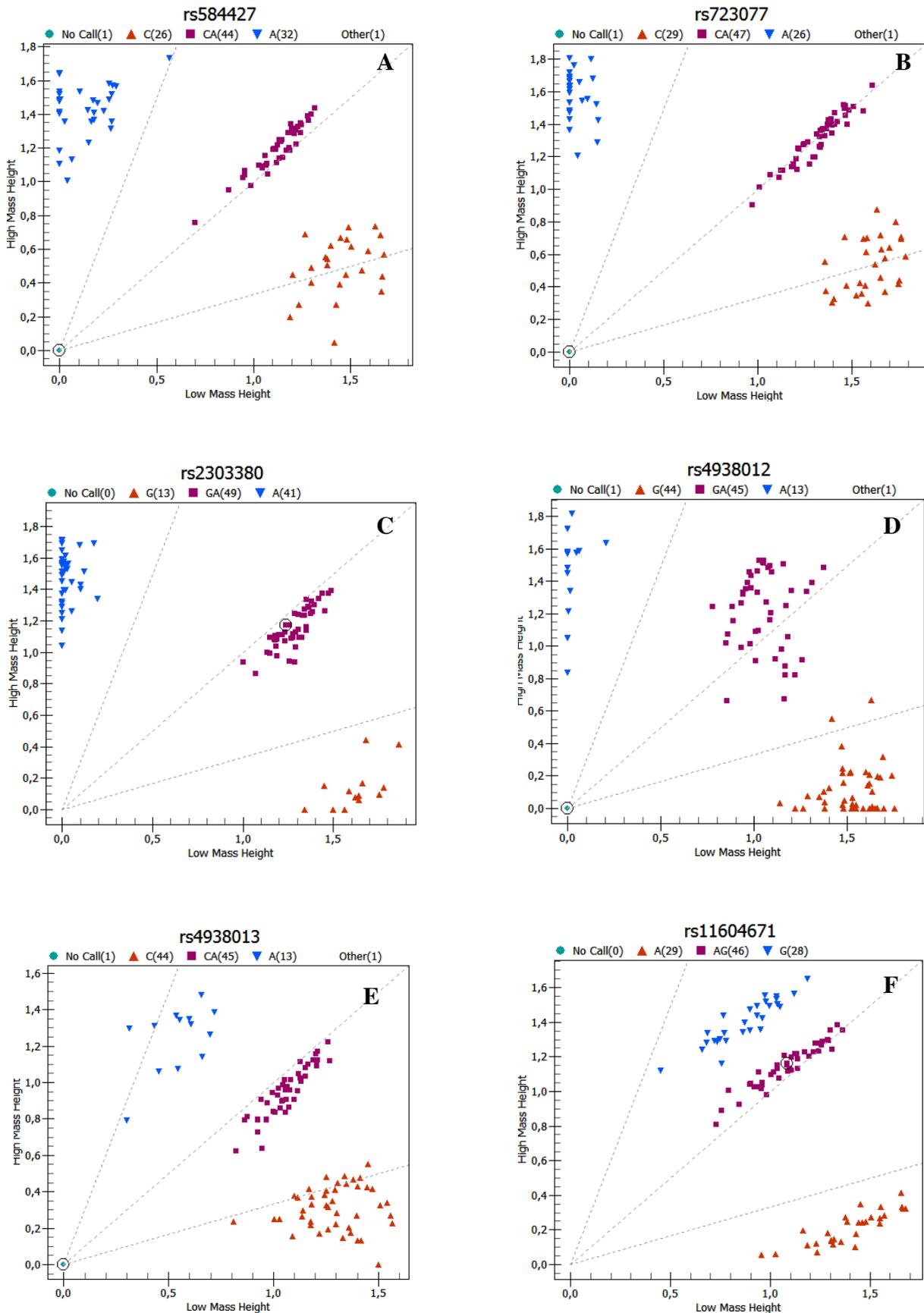


Figura 13. Discriminación alélica del grupo control. A) polimorfismo rs584427 B) polimorfismo rs723077 C) polimorfismo rs2303380 D) polimorfimo rs4938012 E) polimorfismo rs4938013 y F) polimorfismo rs11604671

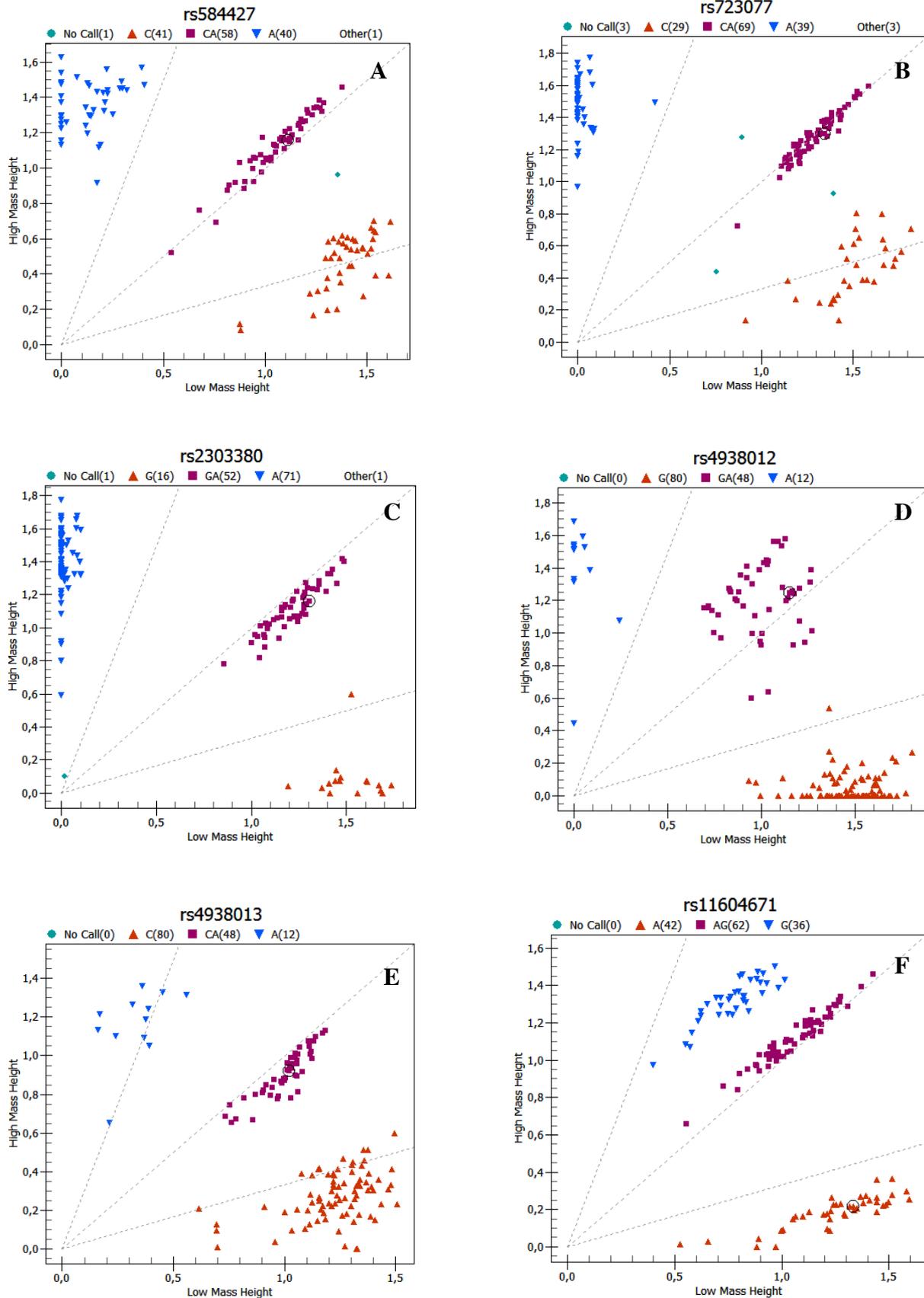


Figura 14. Discriminación alélica de los pacientes. A) polimorfismo rs584427 B) polimorfismo rs723077 C) polimorfismo rs2303380 D) polimorfismo rs4938012 E) polimorfismo rs4938013 y F) polimorfismo rs11604671

4.3.2. Descripción estadística de los polimorfismos

El estudio estadístico incluye un análisis descriptivo de los polimorfismos y el posterior análisis de asociación.

4.3.2.1. CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS.

El análisis descriptivo de los polimorfismos se detalla a continuación con la estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas.

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A | 191 | 0.52 | 92 | p= 0.54 | 99 | p= 0.5 |
| C | 179 | 0.48 | 78 | q= 0.46 | 101 | q= 0.5 |

Tabla 23. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs584427

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A/A | 55 | 0.3 | 27 | p ² = 0.32 | 28 | p ² = 0.28 |
| A/C | 81 | 0.44 | 38 | 2pq= 0.45 | 43 | 2pq= 0.43 |
| C/C | 49 | 0.26 | 20 | q ² = 0.24 | 29 | q ² = 0.29 |

Tabla 24. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs584427

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A | 190 | 0.51 | 82 | p= 0.48 | 108 | p= 0.54 |
| C | 180 | 0.49 | 88 | q= 0.52 | 92 | q= 0.46 |

Tabla 25. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs723077

RESULTADOS

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A/A | 52 | 0.28 | 22 | $p^2 = 0.26$ | 30 | $p^2 = 0.30$ |
| A/C | 86 | 0.46 | 38 | $2pq = 0.45$ | 48 | $2pq = 0.48$ |
| C/C | 47 | 0.25 | 25 | $q^2 = 0.29$ | 22 | $q^2 = 0.22$ |

Tabla 26. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs723077

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A | 239 | 0.65 | 102 | $p = 0.60$ | 137 | $p = 0.68$ |
| G | 131 | 0.35 | 68 | $q = 0.40$ | 163 | $q = 0.32$ |

Tabla 27. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs2303380

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| A/A | 78 | 0.42 | 28 | $p^2 = 0.33$ | 50 | $p^2 = 0.50$ |
| A/G | 83 | 0.45 | 46 | $2pq = 0.54$ | 37 | $2pq = 0.37$ |
| G/G | 24 | 0.13 | 11 | $q^2 = 0.13$ | 13 | $q^2 = 0.13$ |

Tabla 28. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs2303380

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| G | 253 | 0.68 | 107 | $p = 0.63$ | 146 | $p = 0.73$ |
| A | 117 | 0.32 | 63 | $q = 0.37$ | 54 | $q = 0.27$ |

Tabla 29. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs4938012

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| G/G | 88 | 0.48 | 32 | $p^2 = 0.38$ | 56 | $p^2 = 0.56$ |
| G/A | 77 | 0.42 | 43 | $2pq = 0.51$ | 34 | $2pq = 0.34$ |
| A/A | 20 | 0.11 | 10 | $q^2 = 0.12$ | 10 | $q^2 = 0.10$ |

Tabla 30. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs4938012

RESULTADOS

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| C | 253 | 0.68 | 107 | p= 0.63 | 146 | p= 0.73 |
| A | 117 | 0.32 | 63 | q= 0.37 | 54 | q= 0.27 |

Tabla 31. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs4938013

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| C/C | 88 | 0.48 | 32 | p ² = 0.38 | 56 | p ² = 0.56 |
| C/A | 77 | 0.42 | 43 | 2pq= 0.51 | 34 | 2pq= 0.34 |
| A/A | 20 | 0.11 | 10 | q ² = 0.12 | 10 | q ² = 0.10 |

Tabla 32. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs4938013

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|------------|----------|------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| G | 191 | 0.52 | 89 | p= 0.52 | 102 | p= 0.51 |
| A | 179 | 0.48 | 81 | q= 0.48 | 98 | q= 0.49 |

Tabla 33. Frecuencias alélicas del polimorfismo rs11604671

| Alelo | TOTAL | | CONTROLES | | CASOS | |
|-------|----------|------------|-----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia | Recuento | Frecuencia |
| G/G | 55 | 0.30 | 25 | p ² = 0.29 | 30 | p ² = 0.30 |
| G/A | 81 | 0.44 | 39 | 2pq= 0.46 | 42 | 2pq= 0.42 |
| A/A | 49 | 0.26 | 21 | q ² = 0.25 | 28 | q ² = 0.28 |

Tabla 34. Frecuencias genotípicas del polimorfismo rs11604671

Todos los marcadores estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto en el grupo control como en el grupo de casos. El p-valor es mayor de 0'05 y por tanto se acepta la hipótesis inicial de equilibrio. Se demuestra la independencia de los alelos y se puede proceder al estudio estadístico de asociación (Tabla 35).

RESULTADOS

| | rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 |
|------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| CONTROLES | 0.38 | 0.38 | 0.36 | 0.49 | 0.49 | 0.42 |
| CASOS | 0.16 | 0.84 | 0.17 | 0.20 | 0.20 | 0.30 |

Tabla 35. Comprobación del equilibrio de HARDY-WEINBERG. Estadístico Chi-cuadrado

4.3.2.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN

Antes de proceder con el estudio de asociación se realizan las tablas de contingencia correspondientes para cada polimorfismo (Tabla 36)

- Tablas de contingencia

| GEN NCAM1 | rs584427 | | | Total |
|--------------|----------|----|----|-------|
| | AA | AC | CC | |
| Pacientes | 28 | 43 | 29 | 100 |
| Controles | 27 | 38 | 20 | 85 |
| Total | 55 | 81 | 49 | 185 |

| GEN TTC12 | rs723077 | | | Total |
|--------------|----------|----|----|-------|
| | AA | AC | CC | |
| Pacientes | 30 | 48 | 22 | 100 |
| Controles | 22 | 38 | 25 | 85 |
| Total | 52 | 86 | 47 | 185 |

| GEN TTC12 | rs2303380 | | | Total |
|--------------|-----------|----|----|-------|
| | AA | AG | GG | |
| Pacientes | 50 | 37 | 13 | 100 |
| Controles | 28 | 46 | 11 | 85 |
| Total | 78 | 83 | 24 | 185 |

| GEN ANKK1 | rs4938012 | | | Total |
|--------------|-----------|----|----|-------|
| | AA | AG | GG | |
| Pacientes | 10 | 34 | 56 | 100 |
| Controles | 10 | 43 | 32 | 85 |
| Total | 20 | 77 | 88 | 185 |

| GEN ANKK1 | rs4938013 | | | Total |
|--------------|-----------|----|----|-------|
| | AA | AC | CC | |
| Pacientes | 10 | 34 | 56 | 100 |
| Controles | 10 | 43 | 32 | 85 |
| Total | 20 | 77 | 88 | 185 |

| GEN ANKK1 | rs11604671 | | | Total |
|--------------|------------|----|----|-------|
| | AA | AG | GG | |
| Pacientes | 28 | 42 | 30 | 100 |
| Controles | 21 | 39 | 25 | 85 |
| Total | 49 | 81 | 55 | 185 |

Tabla 36. Tablas de contingencia de los polimorfismos estudiados

- Prueba de Chi-cuadrado

rs584427

Este marcador, estudiado de manera independiente, no dispone ningún indicio de significancia estadística (Tabla 37). El valor $\chi^2_{2\text{ gl}} = 0.769$, está muy alejado del teórico valor $\chi^2_{2\text{ gl}} = 5.9915$ ($\alpha = 0.05$), por tanto las diferencias observada entre los genotipos no son suficientes para explicar un asociación con la enfermedad (Tabla 38).

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 0.769 | 2 | 0.681 |

Tabla 37. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para el polimorfismo rs584427

| Modelo | Genotipo | Controles | Casos | OR (95% CI) | p-valor | AIC |
|-------------|----------|------------|----------|------------------|---------|-------|
| Codominante | A/A | 27 (31.8%) | 28 (28%) | 1.00 | 0.68 | 260.5 |
| | A/C | 38 (44.7%) | 43 (43%) | 1.09 (0.55-2.17) | | |
| | C/C | 20 (23.5%) | 29 (29%) | 1.40 (0.64-3.04) | | |
| Dominante | A/A | 27 (31.8%) | 28 (28%) | 1.00 | 0.58 | 258.9 |
| | A/C-C/C | 58 (68.2%) | 72 (72%) | 1.20 (0.64-2.25) | | |
| Recesivo | A/A-A/C | 65 (76.5%) | 71 (71%) | 1.00 | 0.4 | 258.5 |
| | C/C | 20 (23.5%) | 29 (29%) | 1.33 (0.68-2.57) | | |

Tabla 38. Ajuste según el modelo de herencia

rs723077

No se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes y el grupo control para el polimorfismo rs723077 (Tabla 39). No existe ningún genotipo que esté representado de forma significativa en los pacientes (Tabla 40).

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,378 | 2 | 0,502 |

Tabla 39. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para el polimorfismo rs723077

RESULTADOS

| Modelo | Genotipo | Controles | Casos | OR (95% CI) | p-valor | AIC |
|-------------|----------|------------|----------|------------------|---------|-------|
| Codominante | A/A | 22 (25.9%) | 30 (30%) | 1.00 | 0.5 | 259.9 |
| | A/C | 38 (44.7%) | 48 (48%) | 0.93 (0.46-1.86) | | |
| | C/C | 25 (29.4%) | 22 (22%) | 0.65 (0.29-1.43) | | |
| Dominante | A/A | 22 (25.9%) | 30 (30%) | 1.00 | 0.53 | 258.9 |
| | A/C-C/C | 63 (74.1%) | 70 (70%) | 0.81 (0.43-1.56) | | |
| Recesivo | A/A-A/C | 60 (70.6%) | 78 (78%) | 1.00 | 0.25 | 257.9 |
| | C/C | 25 (29.4%) | 22 (22%) | 0.68 (0.35-1.32) | | |

Tabla 40. Ajuste según el modelo de herencia

rs2303380

La distribución de las variantes de este marcador difiere entre casos y controles. Estas diferencias son estadísticamente significativas, asumiendo un 4.6% de error tipo I, el valor $\chi^2_{2\text{ gl}} = 6.217$ (Tabla 41). Estos resultados son compatibles con una asociación genética del polimorfismo rs2303380. El alelo A en homocigosis está asociado con la dependencia a la cocaína con un p-valor = 0.019 (Tabla 42)

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 6,172 | 2 | 0,046 |

Tabla 41. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para el polimorfismo rs2303380

| Modelo | Genotipo | Controles | Casos | OR (95% CI) | p-valor | AIC |
|-------------|----------|------------|----------|-------------------------|---------|-------|
| Codominante | G/G | 11 (12.9%) | 13 (13%) | 1.00 | 0.045 | 255 |
| | A/G | 46 (54.1%) | 37 (37%) | 0.68 (0.27-1.69) | | |
| | A/A | 28 (32.9%) | 50 (50%) | 1.51 (0.60-3.82) | | |
| Dominante | G/G | 11 (12.9%) | 13 (13%) | 1.00 | 0.99 | 259.2 |
| | A/G-A/A | 74 (87.1%) | 87 (87%) | 0.99 (0.42-2.35) | | |
| Recesivo | G/G-A/G | 57 (67.1%) | 50 (50%) | 1.00 | 0.019 | 253.7 |
| | A/A | 28 (32.9%) | 50 (50%) | 2.04 (1.12-3.70) | | |

Tabla 42. Ajuste según el modelo de herencia

RESULTADOS

rs4938012 y rs4938013

Estos marcadores localizados en el gen ANKK1 son contiguos, concretamente en el intrón 1 y exón 2 respectivamente. Este hecho hace que se hereden juntos y a efecto de frecuencias se comporten como uno sólo.

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 6,423 | 2 | 0,040 |

Tabla 43. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para los polimorfismos rs4938012 y rs4938013

| Modelo | Genotipo | Controles | Casos | OR (95% CI) | p-valor | AIC |
|-------------|----------|------------|----------|-------------------------|---------|-------|
| Codominante | A/A | 10 (11.8%) | 10 (10%) | 1.00 | 0.039 | 254.8 |
| | A/G | 43 (50.6%) | 34 (34%) | 0.79 (0.30-2.12) | | |
| | G/G | 32 (37.6%) | 56 (56%) | 1.75 (0.66-4.65) | | |
| Dominante | A/A | 10 (11.8%) | 10 (10%) | 1.00 | 0.7 | 259.1 |
| | A/G-G/G | 75 (88.2%) | 90 (90%) | 1.20 (0.47-3.04) | | |
| Recesivo | A/A-A/G | 53 (62.4%) | 44 (44%) | 1.00 | 0.012 | 253 |
| | G/G | 32 (37.6%) | 56 (56%) | 2.11 (1.17-3.80) | | |

Tabla 44. Ajuste según el modelo de herencia

El análisis estadístico arroja un valor de $\chi^2_{2\text{ gl}} = 6.423$ con una significancia estadística de 0.04 (Tabla 43) y dispone a los dos marcadores como responsables de una predisposición genética al consumo de cocaína, pues las diferencias observadas entre grupos son significativas. El alelo G en homocigosis está asociado con la dependencia a la cocaína con un p-valor = 0.012 (Tabla 44)

rs11604671

A continuación se detallan los resultados del polimorfismo rs11604671, localizado en el exón 6 del gen ANKK1

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-------------------------|-------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 0.352 | 2 | 0.839 |

Tabla 45. Análisis de asociación mediante estadístico Chi-cuadrado para el polimorfismo rs11604671

RESULTADOS

El valor de la prueba es inferior al valor teórico $\chi^2_{2\text{ gl}} = 5.9915$, por tanto no se puede rechazar la hipótesis nula de igualdad de frecuencias. La significancia estadística está muy lejos del 5%, por tanto todas las diferencias en las frecuencias observadas entre casos y controles son asumidas por el azar. El marcador rs723077 no muestra evidencias estadísticas de asociación con la enfermedad (Tabla 45).

4.4. ANÁLISIS COMBINADO DE SNP: HAPLOTIPOS

Para este trabajo, se ha decidido estudiar la combinación génica de siete variantes: rs584427, rs723077, rs2303380, rs4938012, rs4938013, rs11604671, rs1800497 en la región cromosómica ocupada por los genes *NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2* (NTAD)

4.4.1. Desequilibrio de ligamiento entre SNP

El desequilibrio de ligamiento para los 7 SNP estudiados fue calculado mediante el programa informático SNPStats y se muestra en la Figura 15.

| | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | TAQIA |
|------------|---|---|--|--|--|--|
| rs584427 | -0.01252 0.0532 -0.09014 0.9301 0.3348 185 | -0.00192 0.0112 -0.00801 0.0238 0.8775 185 | -0.01224 0.0800 -0.05269 1.0270 0.3109 185 | -0.01224 0.0800 -0.05269 1.0270 0.3109 185 | 0.00799 0.0240 0.02400 0.2130 0.6444 185 | 0.02578 0.1502 0.10950 4.4367 0.0352 185 |
| rs723077 | | -0.00782 0.0454 -0.03271 0.3960 0.5292 185 | -0.01433 0.0932 -0.06166 1.4068 0.2356 185 | -0.01433 0.0932 -0.06166 1.4068 0.2356 185 | 0.05871 0.2363 0.23507 20.4450 6.14e-06 185 | 0.01563 0.0881 0.06384 1.5078 0.2195 185 |
| rs2303380 | | | 0.17234 0.8437 0.77500 222.2304 2.2e-16 185 | 0.17234 0.8437 0.77500 222.2304 2.2e-16 185 | -0.14240 0.8313 -0.39384 131.3579 2e-16 185 | 0.08388 0.2906 0.37233 51.2930 7.96e-13 185 |
| rs4938012 | | | | 0.21618 0.9968 0.99678 369.8363 2e-16 185 | -0.14967 0.9784 -0.64409 153.4962 2e-16 185 | 0.05439 0.2577 0.24830 22.8113 1.79e-06 185 |
| rs4938013 | | | | | -0.14967 0.9784 -0.64409 153.4962 2e-16 185 | 0.05439 0.2577 0.24830 22.8113 1.79e-06 185 |
| rs11604671 | | | | | | -0.07121 0.4428 -0.39249 33.8554 5.84e-09 185 |

Figura 15. Desequilibrio de ligamiento.

Los marcadores que presentan mayor grado de ligamiento son rs2303380, rs4938012, rs4938013, rs11604671 y rs1800497, precisamente los que se localizan más próximos al telómero del cromosoma 11 y en todos, a excepción de rs11604671, se ha detectado significancia estadística cuando se analizaron individualmente. Dentro de este grupo de marcadores, los que se encuentran en un estado de ligamiento prácticamente perfecto ($D' = 0.9998$ y $r = 0.999978$) son rs4938012 y rs4938013. Se localizan muy próximos y a efectos estadísticos se comportan como un único marcador, pues entre ambos no se produce ninguna recombinación, transmitiéndose la misma combinación de alelos a la descendencia. Esta región incluye los genes TTC12 y ANKK1

Los marcadores rs584427 y rs723077 presentan los grados de ligamiento más bajos, especialmente con rs2303380, a pesar de ser el marcador que les sigue en cercanía.

El marcador rs584427 se localiza en el gen NCAM, el más grande de los cuatro que conforman el grupo NTAD con 317 kb. Esta distancia que lo separa del resto incorpora puntos de recombinación responsables de disminuir el grado de ligamiento con el resto de genes.

Los dos marcadores localizados en el gen TTC12 se comportan como si se localizasen en bloques distintos, pues prácticamente no presentan ligamiento lo que sugiere una zona de alta recombinación a pesar de que los separan muy pocas bases.

4.4.2. Estimación de las frecuencias haplotípicas

Los haplotipos más frecuentes así como la estimación de sus frecuencias se muestran en la tabla 46

| rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | TAQIA | Total | Casos | Controles |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|--------|--------|-----------|
| A | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1294 | 0.1356 | 0.1176 |
| C | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1174 | 0.1024 | 0.1557 |
| A | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0677 | 0.0793 | 0.0572 |
| A | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0618 | 0.0377 | 0.0614 |
| C | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0572 | 0.0253 | 0.0662 |
| C | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0517 | 0.0197 | 0.1006 |
| A | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0505 | 0.0296 | 0.0688 |
| C | A | A | G | C | A | A ₁ | 0.0482 | 0.0408 | 0.0339 |
| A | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0458 | 0.0535 | 0.0741 |
| A | A | G | A | A | G | A ₁ | 0.0383 | 0 | 0.0622 |
| C | C | G | G | C | G | A ₁ | 0.0345 | 0.0402 | 0.0202 |
| C | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.034 | 0.0671 | 0.0161 |
| C | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0333 | 0.0285 | 0.0089 |
| A | C | G | A | A | G | A ₂ | 0.0267 | 0.0129 | 0.0373 |
| A | C | A | G | C | A | A ₁ | 0.0262 | 0.0211 | 0.0275 |
| C | A | G | A | A | G | A ₁ | 0.025 | 0.0545 | NA |
| A | A | A | G | C | G | A ₁ | 0.019 | 0.0506 | NA |
| C | A | A | G | C | G | A ₁ | 0.0186 | 0.0191 | 0.0101 |
| A | C | A | A | A | G | A ₂ | 0.0146 | NA | NA |
| C | C | A | G | C | G | A ₂ | 0.0125 | 0.0066 | 0.0284 |
| C | C | A | G | C | A | A ₁ | 0.0111 | 0.0198 | NA |
| A | C | G | G | C | A | A ₁ | 0.0104 | NA | 0.0185 |

Tabla 46. Frecuencias de los haplotipos más frecuentes

4.4.3. Análisis de asociación

Realizamos un análisis múltiple de polimorfismos o análisis de haplotipos. Si imaginamos el conjunto de SNP elegidos como un haplotipo global, la asociación es estadísticamente muy significativa con un p-valor = 0'00018. Si centramos nuestra atención en las distintas combinaciones alcanzadas por estos SNP, cuatro son los haplotipos que despuntan del resto. El haplotipo constituido por CAAGCGA₂ está representado en un porcentaje cercano al 7% en los casos mientras que no llega al 2% en los controles, con un p-valor= 0'031 se relaciona significativamente con la enfermedad. Existen otros tres haplotipos con significancia estadística, CAGAAAGA₂ (p= 0.022), ACGAAGA₂ (p= 0.032) y CCAAGGA₂ (p= 0.029) representados con mayor frecuencia en el grupo control.

RESULTADOS

El primero de los haplotipos descritos, con un elevado porcentaje en el grupo control 10% se distancia de un porcentaje que no supera el 2% en los pacientes. Los dos haplotipos siguientes, presentan un porcentaje cercano al 4% y 3% respectivamente, a diferencia de lo que ocurre en el grupo formado por los pacientes donde estos haplotipos no llegan al 1%. Se intuye que estas tres combinaciones podrían aportar un efecto protector a los portadores pues arrojan unos OR [0.01 (0.00 – 0.09), 0.09 (0.01 – 0.80) y 0.03 (0.00 – 0.69)] reflejo de una relación inversa con la enfermedad (Tabla 47).

| rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | TAQIA | Frecuencia | OR (95% CI) | P-valor |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|------------|-------------------------|---------|
| A | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1258 | 1.00 | --- |
| C | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1244 | 0.61 (0.19 - 1.90) | 0.39 |
| A | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0707 | 1.19 (0.25 - 5.74) | 0.83 |
| A | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0546 | 0.73 (0.15 - 3.62) | 0.71 |
| C | A | A | G | C | A | A ₁ | 0.0538 | 2.57 (0.43 - 10.03) | 0.30 |
| A | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0528 | 0.48 (0.08 - 2.77) | 0.42 |
| A | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0506 | 0.67 (0.16 - 2.75) | 0.58 |
| C | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.05 | 0.01 (0.00 - 0.49) | 0.022 |
| C | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0438 | 25.75 (1.38 - 47.91) | 0.031 |
| C | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0422 | 0.32 (0.05 - 1.89) | 0.21 |
| A | A | G | A | A | G | A ₁ | 0.0364 | 0.25 (0.04 - 1.76) | 0.17 |
| A | C | G | A | A | G | A ₂ | 0.0335 | 0.09 (0.01 - 0.80) | 0.032 |
| C | C | G | G | C | G | A ₁ | 0.031 | 1.56 (0.20 - 12.37) | 0.95 |
| A | C | A | G | C | A | A ₁ | 0.0265 | 1.08 (0.12 - 9.42) | 0.67 |
| C | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0205 | 2.18 (0.08 - 57.61) | 0.64 |
| C | C | A | G | C | G | A ₂ | 0.0199 | 0.03 (0.00 - 0.69) | 0.029 |
| C | A | A | G | C | G | A ₁ | 0.0168 | 15.12 (0.18 - 1244) | 0.23 |
| A | C | G | G | C | A | A ₁ | 0.011 | 0.46 (0.02 - 9.07) | 0.61 |
| C | C | A | G | C | A | A ₁ | 0.0079 | 1.66 (0.00 - 803.7) | 0.87 |

Asociación haplotípica global: P-valor = 0.00018

Tabla 47. Asociación de los haplotipos

4.5. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN POR SEXOS

Una vez conocida la predisposición que aporta cada uno de los polimorfismos a desarrollar dependencia a la cocaína, se analiza si existen diferencias de predisposición entre sexos y se construyen las tablas de contingencia para cada uno de los polimorfismos (Tabla 48).

| | | rs584427 | | | Total |
|-------|-----------|----------|----|----|-------|
| | | AA | AC | CC | |
| Sexo | Masculino | 22 | 36 | 19 | 77 |
| | Femenino | 6 | 7 | 10 | 23 |
| Total | | 28 | 43 | 29 | 100 |

| | | rs723077 | | | Total |
|-------|-----------|----------|----|----|-------|
| | | AA | AC | CC | |
| Sexo | Masculino | 25 | 35 | 17 | 77 |
| | Femenino | 5 | 13 | 5 | 23 |
| Total | | 30 | 48 | 22 | 100 |

| | | rs2303380 | | | Total |
|-------|-----------|-----------|----|----|-------|
| | | AA | AG | GG | |
| Sexo | Masculino | 42 | 27 | 8 | 77 |
| | Femenino | 8 | 10 | 5 | 23 |
| Total | | 50 | 37 | 13 | 100 |

| | | rs4938012 | | | Total |
|-------|-----------|-----------|----|----|-------|
| | | GG | AG | AA | |
| Sexo | Masculino | 45 | 24 | 8 | 77 |
| | Femenino | 11 | 10 | 2 | 23 |
| Total | | 56 | 34 | 10 | 100 |

| | | rs4938013 | | | Total |
|-------|-----------|-----------|----|----|-------|
| | | CC | AC | AA | |
| Sexo | Masculino | 45 | 24 | 8 | 77 |
| | Femenino | 11 | 10 | 2 | 23 |
| Total | | 56 | 34 | 10 | 100 |

| | | rs11604671 | | | Total |
|-------|-----------|------------|----|----|-------|
| | | GG | AG | AA | |
| Sexo | Masculino | 22 | 32 | 23 | 77 |
| | Femenino | 8 | 10 | 5 | 23 |
| Total | | 30 | 42 | 28 | 100 |

| | | TAQIA | | | Total |
|-------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| | | A ₂ A ₂ | A ₁ A ₂ | A ₁ A ₁ | |
| Sexo | Masculino | 33 | 31 | 13 | 77 |
| | Femenino | 6 | 14 | 3 | 23 |
| Total | | 39 | 45 | 16 | 100 |

Tabla 48. Distribución de los genotipos por sexo en el grupo de pacientes dependientes a la cocaína.

El número de pacientes dependientes a cocaína se inclina hacia el sexo masculino (77%) con una representación de las tres cuartas partes del total, mientras que tan solo una cuarta parte del total corresponde al sexo femenino (23%), siendo el menos representado en el conjunto de consumidores de cocaína seleccionados. A simple vista, parece que los genotipos se distribuyen de forma semejante en hombres y mujeres, pero para comprobarlo se realiza la prueba de la Chi-cuadrado, con los siguientes resultados:

RESULTADOS

| | rs584427 | | |
|-------------------------|-----------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 3,295 | 2 | 0,193 |

| | rs723077 | | |
|-------------------------|-----------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,132 | 2 | 0,568 |

| | rs2303380 | | |
|-------------------------|------------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 3,477 | 2 | 0,176 |

| | rs4938012 | | |
|-------------------------|------------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,196 | 2 | 0,550 |

| | rs4938013 | | |
|-------------------------|------------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,196 | 2 | 0,550 |

| | rs11604671 | | |
|-------------------------|-------------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 0,661 | 2 | 0,718 |

| | TaQIA | | |
|-------------------------|--------------|----|-----------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica |
| Chi-cuadrado de Pearson | 3,112 | 2 | 0,211 |

Tabla 49. Pruebas Chi-cuadrado para la covariable sexo en el grupo de pacientes dependientes a cocaína.

En el grupo de pacientes dependientes a la cocaína, no se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres en ninguno de los marcadores seleccionados, por tanto no existe ninguno de ellos que despunte sobre los demás, guardando cierto grado de equilibrio entre sexos (Tabla 49). De entre los siete polimorfismos estudiados, rs584427, rs2303380 y rs1800497 son los que proyectan mayor grado de disparidad entre sexos ($p= 0.193, 0.176$ y 0.211) con un predominio del alelo mayor en los varones que no se observa en las mujeres.

Se puede realizar un análisis de haplotipos solo en varones si prescindimos de los resultados obtenidos en las mujeres de ambos grupos. En mujeres, el análisis de haplotipos no es posible por la baja representación. Las frecuencias haplotípicas más representadas en varones dependientes a cocaína y varones del grupo control se muestran en la tabla 50. El haplotipo más frecuente de los varones que integran el grupo control es el constituido por la secuencia de polimorfismos CCAGCAA₂, asignada a un 20% de los individuos. Este haplotipo difiere con el más representado de los pacientes dependientes (14%), en el polimorfismo rs584427, el primero de la secuencia ACAGCAA₂, cambiando una Citosina por una Adenina.

RESULTADOS

| rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | TAQIA | Total | Casos | Controles |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|--------|--------|-----------|
| C | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1525 | 0.0996 | 0.2015 |
| A | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.0896 | 0.1473 | 0.0455 |
| A | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0886 | 0.0868 | 0.0912 |
| A | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0691 | 0.049 | 0.0751 |
| A | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0675 | 0.0406 | 0.1029 |
| A | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0557 | 0.0447 | 0.1043 |
| C | A | A | G | C | A | A ₁ | 0.0536 | 0.0372 | 0.0533 |
| C | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.0523 | 0.0281 | 0.0468 |
| C | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0379 | 0 | 0.0832 |
| A | C | A | G | C | A | A ₁ | 0.0309 | 0.0246 | 0.0343 |
| C | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0301 | 0.0268 | 0.011 |
| C | C | G | G | C | G | A ₁ | 0.0301 | 0.0314 | 0.0155 |

Tabla 50. Frecuencias haplotípicas de varones dependientes a cocaína y varones del grupo control

En función del haplotipo más frecuente se realiza el cálculo de las Odds ratio y el p-valor para comprobar si existe algún haplotipo que aumente el riesgo genético o que por el contrario, aporte algún tipo de protección hacia la dependencia (Tabla 51).

| rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | TAQIA | Frecuencia | OR (95% CI) | P-valor |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|----------------|------------|-------------------------------|---------------|
| C | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1474 | 1.00 | --- |
| A | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.0957 | 5.91 (1.25 - 28.01) | 0.027 |
| A | A | A | G | C | A | A ₂ | 0.091 | 2.45 (0.57 - 10.45) | 0.23 |
| A | A | G | A | A | G | A ₂ | 0.0694 | 1.33 (0.24 - 7.23) | 0.74 |
| A | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0606 | 2.03 (0.41 - 10.03) | 0.39 |
| C | A | A | G | C | A | A ₁ | 0.0603 | 5.85 (0.81 - 42.02) | 0.082 |
| A | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0569 | 1.57 (0.36 - 6.81) | 0.55 |
| C | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0425 | 6.72 (1.55 - 32.03) | 0.0001 |

Tabla 51. Análisis de asociación por haplotipos tomando los genotipos obtenidos en los varones

Existe un haplotipo (CCAGCAA₂) que difiere del resto y parece conferir cierta ventaja a los portadores, pues curiosamente corresponde con el haplotipo más frecuente registrado en el grupo control (20%). Destaca el haplotipo ACAGCAA₂ como claro candidato que aporta un riesgo asociado a los portadores, con un valor OR= 5.91 y un p-valor= 0.027

4.6. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN EN LOS CONSUMIDORES PRIMARIOS DE COCAÍNA

Los pacientes dependientes a cocaína que confirman no consumir ninguna otra droga en su rutina diaria son pocos, sólo 28 pacientes, pero constituyen un grupo de especial interés que requiere un análisis aislado.

Para igualar los tamaños muestrales, se analizan las diferencias observadas entre los 28 casos y 50 controles para cada polimorfismo. Los resultados de los polimorfismos con significación estadística se recogen en la tabla 52

| | rs4938012 | | |
|------------------------------|-----------|----|-----------------------------|
| | Valor | gl | Sig. Asintótica (bilateral) |
| Asociación lineal por lineal | 4,178 | 1 | 0,041 |

| | rs4938013 | | |
|------------------------------|-----------|----|-----------------------------|
| | Valor | gl | Sig. Asintótica (bilateral) |
| Asociación lineal por lineal | 4,178 | 1 | 0,041 |

Tabla 52. Prueba estadística de los polimorfismos con significancia

El resumen derivado de aplicar el análisis de asociación para haplotipos se detalla en la tabla 53, resaltando únicamente los haplotipos que adquieren significación estadística.

| rs584427 | rs723077 | rs2303380 | rs4938012 | rs4938013 | rs1160467 | TAQIA | Frecuencia | P-valor |
|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|------------|---------|
| C | C | A | G | C | A | A ₂ | 0.1478 | --- |
| C | A | A | G | C | G | A ₂ | 0.0421 | <0.0001 |
| A | A | A | G | C | G | A ₁ | 0.0176 | <0.0001 |
| C | C | G | A | A | G | A ₁ | 0.0174 | <0.0001 |

Tabla 53. Haplotipos significativos en dependientes exclusivos de cocaína

4.7. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS POLIMORFISMOS

Existen programas informáticas que predicen las consecuencias que pueden tener las variantes genéticas sobre la proteína o el ARN. Cada programa emplea un método de predicción diferente.

4.7.1. Predicción del efecto sobre la proteína

Los programas de predicción del efecto sobre la proteína analizan no sólo la conservación entre especies del aminoácido en una posición, si no que también valoran la estructura del aminoácido y la localización de éste dentro de la proteína.

En nuestro estudio hemos utilizado tres programas diferentes: Polyphen, SIFT (Tabla 54) y Mutation Taster (Tabla 55). Los resultados se detallan a continuación:

| | ANÁLISIS IN SILICO | | | |
|------------|--------------------|-------|-----------|-------|
| SNP | Polyphen | Score | SIFT | Score |
| rs723077 | Benigno | 0 | Tolerable | 0.96 |
| rs11604671 | Benigno | 0 | Tolerable | 0.5 |
| rs1800497 | Benigno | 0 | Tolerable | 1 |

Tabla 54. Resultados de los programas de predicción

| rs4938012 | rs4938013 | rs11604671 | rs1800497 |
|---|--|---|--|
| Podrían perderse: Dominio quinasa. Sitio activo (aceptor protones). Las 12 repeticiones ANK y fosfotreonina | Podrían perderse: Dominio quinasa. Las 12 repeticiones ANK y fosfotreonina | Podrían perderse: Las 12 repeticiones ANK y fosfotreonina | Pérdida de ANK11 Podría perderse: ANK12 |
| Cambios de sitios de splicing. Incremento donador. | Cambios de sitios de splicing. Incremento donador. | Cambios de sitios de splicing. Ganancia donador | Cambios de sitios de splicing. Incremento y ganancia donador |

Tabla 55. Predicción de posibles alteraciones en las funciones de las proteínas y en los sitios de procesamiento según el programa Mutation Taster

4.7.2. Predicción sobre el procesamiento del ARNm

En el ARNm existen regiones como son el sitio 5' (o donador), el sitio 3' (o aceptor) y el sitio de ramificación, que definen los límites entre el exón y el intrón, que están implicadas directamente en la interacción con el complejo de proteínas y las reacciones de procesamiento del ARNm. Existen también un tipo de regiones de distribución más amplia, con una conocida función de regulación, pues potencian o inhiben el procesamiento, implicando fenómenos de procesamiento alternativo (*Cartegni y cols., 2002*)

El polimorfismo **rs584427** crea en la secuencia tres nuevos sitios de unión para proteínas SR, uno para SRSF1 que en la secuencia original no lleva ningún lugar de unión para esta proteína y uno nuevo para cada una de las proteínas SRSF1 (IgM) y SRSF5 con uno y tres sitios de unión respectivamente en la secuencia inicial (Tabla 56).

| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| | CTCAGCT/2.88673 | GAATGCCA/2.85727 | CTTCACC/3.46012 CCACTCA/3.03463 ACTCAGC/3.38487 | TACTTC/3.22325 |
| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| CCCACTG/2.01682 | CCCACTG/2.74220 CTCAGCT/2.88673 | GAATGCCA/2.85727 | CTTCACC/3.46012 CCACTGC/4.87935 CCACTCA/3.03463 ACTCAGC/3.38487 | TACTTC/3.22325 |

Tabla 56. Predicción de los sitios ESE del polimorfismo rs584427 mediante el programa ESE FINDER

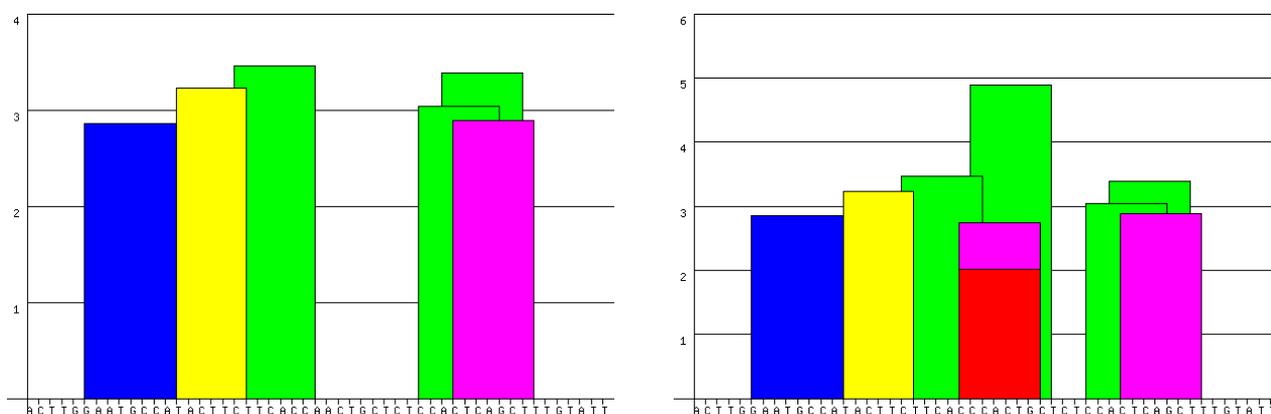


Figura 16. Sitios ESE definidos en la secuencia del polimorfismo rs584427.

RESULTADOS

El polimorfismo **rs723077** genera dos nuevos sitios de unión para las proteínas SRSF1 y SRSF1 (IgM), y amplía en uno los ya existentes para SRSF5. A su vez elimina uno de los tres sitios de unión para la proteína SRSF2 (Tabla 57).

| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
|---------------------------|---------------------------------------|--|---|---------------------------|
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| | | GTCCTCCA/3.95040 AACTGCTA/2.76032 GGTTTCTT/2.63248 | TCAGTCC/3.20610 CCACAAA/3.01814 | |
| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| CTGAAGG/1.96983 | CTGAAGG/2.23870 | GTCCTCCA/3.95040 GGTTTCTT/2.63248 | TCAGTCC/3.20610 CCACAAA/3.01814 TCTGAAG/2.98498 | |

Tabla 57. Predicción sitios ESE del polimorfismo rs723077 mediante el programa ESE FINDER

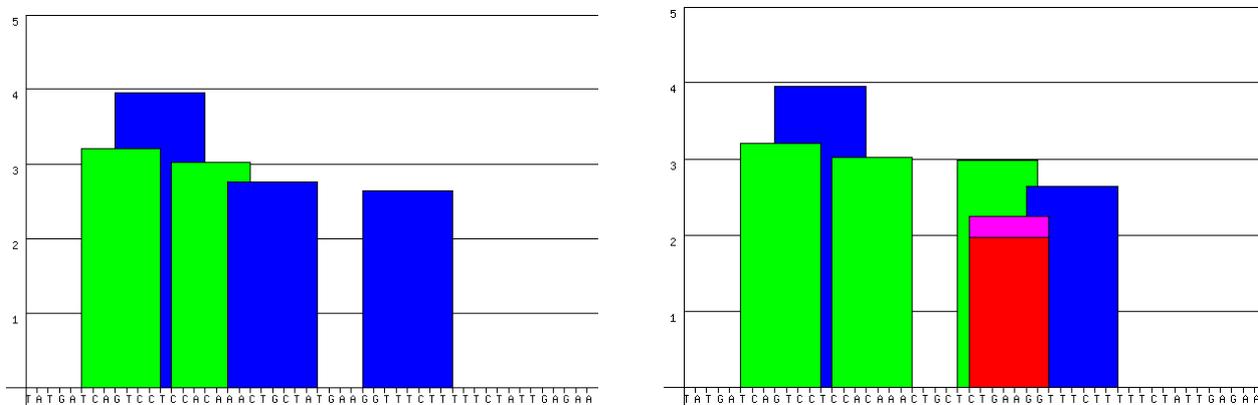


Figura 17. Sitios ESE definidos en la secuencia del polimorfismo rs723077

RESULTADOS

El cambio nucleotídico de **rs4938013**, modifica las dianas de unión a proteínas SR localizadas prácticamente en la misma posición e introduce tres cambios nuevos. Las proteínas SRSF1 y SRSF6 tendrán un nuevo sitio de unión en la secuencia, mientras que la proteína SRSF2 perderá uno de los cuatros que tenía en la secuencia original (Tabla 58).

| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
|---------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| AAGCCGG/2.11734 | CTCCTGG/2.31669 | GGACCTCA/2.61762 GACCTCAA/3.85856 TACTCTG/3.81032 GGACAGCA/2.95892 | CCTCAAG/4.35260 ATACTCC/3.56875 CTCCTGG/3.01437 | TGCATG/3.76391 CATGTC/3.14477 |
| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| AAGCCGG/2.11734 | CTCCTGG/2.31669 | GGACCTCA/2.61762 GACCTCAA/3.85856 GGACAGCA/2.95892 | CCTCAAG/4.35260 CTCCTGG/3.01437 | AACATC/3.03178 TGCATG/3.76391 CATGTC/3.14477 |

Tabla 58. Predicción de sitios ESE para el polimorfismo rs4938013 mediante el programa ESE FINDER

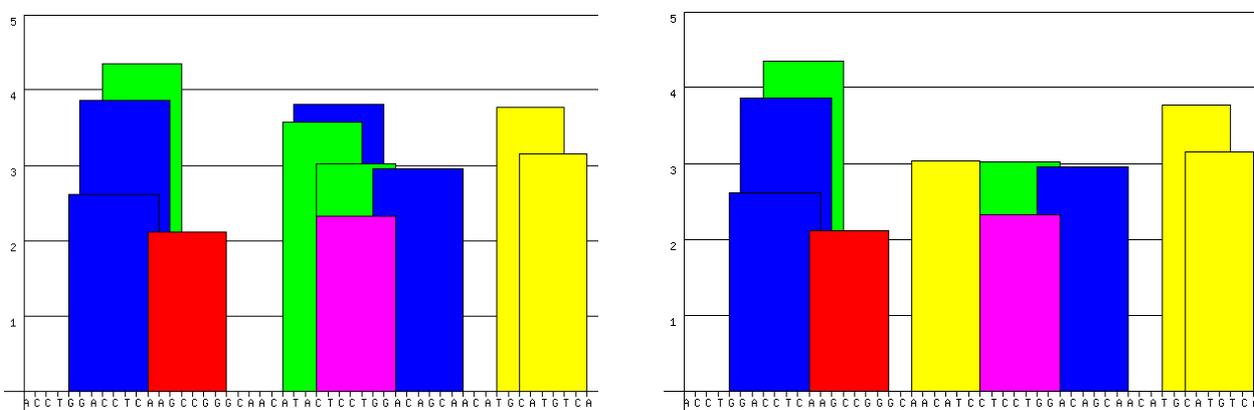


Figura 18. Sitios ESE definidos en la secuencia del polimorfismo rs4938013

RESULTADOS

El cambio generado en **rs11604671** parece ser responsable de la creación de una nueva diana de reconocimiento para la proteínas SRSF1 (IgM) y en contraposición, de la eliminación de otra para SRSF1 (Tabla 59).

| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
|---|---|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| CAGCCCA/2.77157 CCCAGGG/3.53274 GGGAGGT/3.36097 | CGCCAGC/1.95462 CAGCCCA/2.96653 CCCAGGG/4.07758 GGGAGGT/1.98405 | TGTCGCTG/2.93541 | | TGCGCC/3.53067 TGTGTG/2.82087 |
| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| CAGCCCG/2.04479 GGGAGGT/3.36097 | CGCCAGC/1.95462 CAGCCCG/2.53116 CCCGGGG/2.35782 CCGGGGA/2.41192 GGGAGGT/1.98405 | TGTCGCTG/2.93541 | | TGCGCC/3.53067 TGTGTG/2.82087 |

Tabla 59. Predicción de sitios ESE para el polimorfismo rs11604671 mediante el programa ESE FINDER

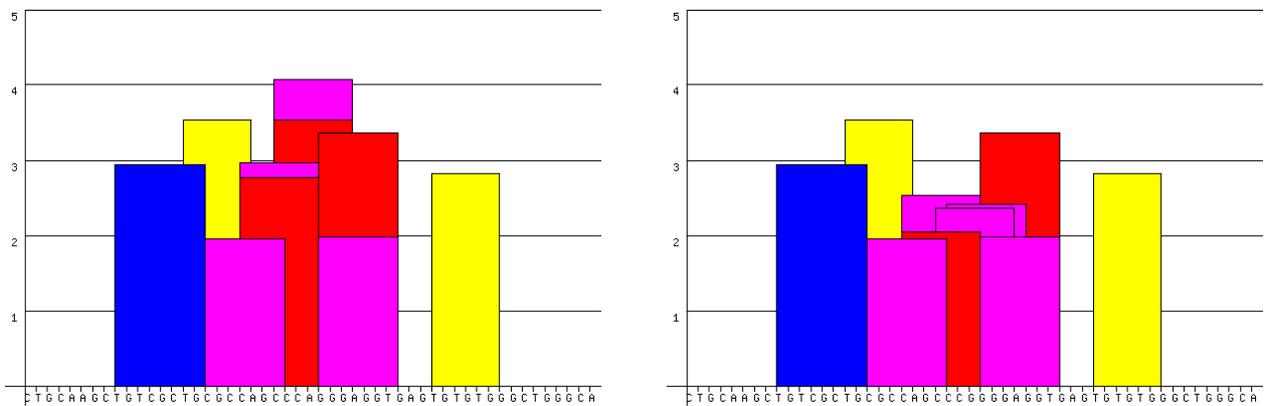


Figura 19. Sitios ESE definidos en la secuencia del polimorfismo rs11604671

RESULTADOS

La secuencia colindante al polimorfismo **rs1800497** es la que lleva mayor número de dianas SR, a su vez el cambio de nucleótido crea un nuevo sitio de unión para la proteína SRSF1 (IgM) y elimina uno de los sitios para SRSF6 (Tabla 60).

| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
|------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| TGGACGT/2.59191 CAGCTGG/2.09880 | TGGACGT/1.98512 CAGCTGG/2.36668 CGCCTGC/2.05714 CTGCCTT/2.41158 | GGCGCCTG/3.75352 GACCAGCA/3.60875 | TGACCAG/3.19805 TTTGAGG/3.24075 | GACGTC/2.71795 TGAGGA/2.81710 |
| SRSF1 threshold: 1.956 | SRSF1 (IgM-BRCA1) threshold: 1.867 | SRSF2 threshold: 2.383 | SRSF5 threshold: 2.67 | SRSF6 threshold: 2.676 |
| Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor | Secuencia/ Valor |
| TGGACGT/2.59191 CAGCTGG/2.09880 | TGGACGT/1.98512 CAGCTGG/2.36668 CGCCTGC/2.05714 | GGCGCCTG/3.75352 GACCAGCA/3.60875 | CGACCAG/2.84136 TTTGAGG/3.24075 | GACGTC/2.71795 TGCCTC/3.83191 TGAGGA/2.81710 |

Tabla 60. Predicción de sitios ESE para el polimorfismo rs1800497

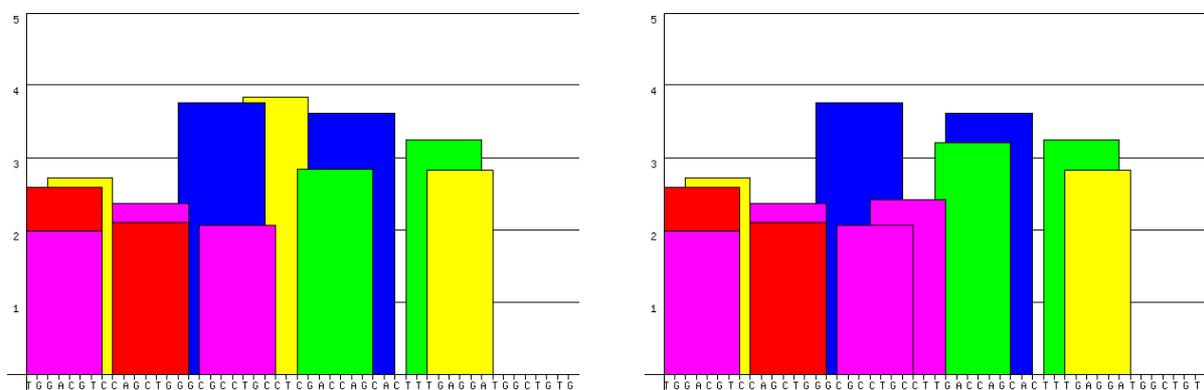


Figura 20. . Sitios ESE definidos en la secuencia del polimorfismo rs1800497

5. DISCUSIÓN

Los fenómenos de drogodependencia han despertado un gran interés entre la comunidad científica que ha proyectado sus investigaciones en comprender la transcendencia de los factores biológicos en el desarrollo del proceso adictivo. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha acelerado el proceso de identificación de genes asociados a enfermedades complejas y se ha mencionado la relación de hasta 1.500 genes con algún comportamiento adictivo (*Li y cols., 2008*). La investigación sobre los mecanismos biológicos responsables de la drogodependencia se complica si se asume que además, existen factores epistáticos (*Carlborg y Haley, 2004*), cambios epigenéticos (*Damez-Werno y cols., 2012*) e interacciones con factores ambientales (*Hunter, 2005; Van Der Veen y cols., 2007*). Hasta el momento, los estudios realizados no han demostrado tener potencia suficiente para explicar por completo la base genética de las adicciones (*Bühler y cols., 2015*), por lo que consideramos importante impulsar nuevas líneas de investigación encaminadas a esclarecer todas estas interacciones.

Nuestro estudio se sustenta en el hecho de que las variantes genéticas localizadas en una región determinada del cromosoma 11, que comprende cuatro genes (*NACM1, TTC12, ANKK1 y DRD2*) relacionados con la transmisión de señales neuronales, podrían ser informativas en individuos dependientes a la cocaína y en concreto, el análisis de las posibles combinaciones de estas variantes en los pacientes podrían definir la existencia de diferentes perfiles de riesgo, describiendo parte de la etiopatogenia de la enfermedad que se sabe que también está modulada por otros factores derivados de hábitos, estilo de vida, estatus socioeconómico y cultural, respaldando la idea de que la genética no determina, sino que predispone.

5.1. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE PACIENTES INCLUIDOS A ESTUDIO

El grupo de pacientes incluidos a estudio se define a través del análisis de las variables sociodemográficas ya que uno de los factores a tener en cuenta a la hora de evaluar el consumo de la cocaína es el contexto social en el que se encuadra. Por ello, hay que tener presente que los pacientes seleccionados estaban emprendiendo un programa de rehabilitación y por tanto eran conscientes y habían asumido su problema de adicción. Aunque estos pacientes componen una muestra limitada de la población general de consumidores dependientes a cocaína, permite realizar inferencias de los perfiles y tendencias del colectivo.

La edad media de los pacientes seleccionados se sitúa en torno a los 35 años, exactamente la misma edad que la comunicada para personas admitidas a tratamiento por cocaína en el informe del Observatorio Español sobre Drogas publicado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (*OED, 2015*). En esta etapa en la que ya se dispone de independencia económica, además aumenta el grado de responsabilidad y se alcanza el grado de madurez suficiente para tomar conciencia de lo que supone sufrir un problema de adicción. El grado de madurez será definitivo para buscar ayuda profesional. Predominan los solteros frente a los casados y divorciados, lo que probablemente guarde relación con las obligaciones familiares que el estado civil lleva asociadas.

Aunque el consumo de la cocaína solía relacionarse con un determinado grupo de personas de posición social elevada (clases media y alta) como droga recreativa elitista, respaldada por el éxito y el prestigio (*Díaz y cols., 1992*), en los últimos años se ha trasladado a un ámbito de ocio nocturno (*Becoña, 2000*) y el colectivo consumidor se ha ido diversificando y extendido a todas las clases sociales, coincidiendo con lo que hemos encontrado en nuestro grupo de estudio. Respecto al nivel de formación alcanzado, éste resulta muy variado y la mayoría no alcanza estudios superiores, sólo el 5% accede a la Universidad. Asimismo, una proporción que supera el tercio de nuestros pacientes afirma haber cursado únicamente estudios primarios, pero la mayoría han completado la educación secundaria o formación profesional, alcanzando un nivel medio de educación, por lo que se entiende que previamente todos los consumidores han sido informados y conocen los riesgos asociados al consumo de la cocaína.

El consumo de cocaína en España está más extendido entre los hombres donde la proporción triplica a la de las mujeres, de acuerdo con el informe del Observatorio Español sobre Drogas (*OED, 2015*), aunque existen estudios que mencionan una tendencia al aumento entre el colectivo de mujeres particularmente entre las adolescentes y las adultas jóvenes (*Calafat y cols., 2001*). Los resultados de nuestro estudio sitúan el porcentaje de mujeres muy por debajo del de los hombres. Por estar los genes seleccionados dentro de la región autosómica, se espera que cualquier diferencia de sexos encontrada en la prevalencia de la adicción se deba más bien a factores psico-sociales. Según la encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (*EDADES, 2013*) incluida el Plan Nacional sobre Drogas, las mujeres son más conscientes que los hombres del riesgo que conlleva el consumo de cocaína. Este hecho podría explicar que la prevalencia de consumo sea inferior en el sexo femenino y por tanto el número de mujeres que solicita tratamiento en un centro de atención especializada sea menor. Además, la presión social que envuelve cualquier toxicomanía afecta en mayor medida a las mujeres (*Sterk, y cols 1999*) y podría ser otra de las razones de una menor representación en los centros de prevención y tratamiento.

El consumo combinado de sustancias diferentes o policonsumo está muy extendido y constituye un comportamiento frecuente entre los hombres (*OED, 2015*), lo que incrementa los riesgos y daños producidos por las mismas, como así lo indica el informe del Observatorio Europeo de las drogas y adicciones (*EMCDDA, 2009*). De los pacientes incluidos en nuestro estudio, aproximadamente las tres cuartas partes menciona consumir además de la cocaína, otras sustancias. Destaca principalmente la combinación con alcohol, que se presenta en un tercio de los pacientes, en concordancia con los datos registrados para la población española (*OED, 2015*). Posiblemente esta combinación se explica por la complementariedad que existe entre estas dos sustancias, mientras la cocaína atenúa los efectos depresores que provoca el alcohol, el alcohol prolonga los efectos euforizantes de la cocaína (*Calafat y cols., 2001*). El cannabis también tiene una prevalencia considerable entre nuestros pacientes, casi una cuarta parte informan haber consumido esta sustancia en el mismo periodo de tiempo que la cocaína. El cannabis es la segunda sustancia consumida, después del alcohol entre los pacientes admitidos a tratamiento por cocaína en España (*OED, 2015*). La explicación podría aplicarse al igual que en el caso anterior, por contrarrestar los efectos euforizantes que provoca la cocaína.

5.2. ESTUDIOS GENÉTICOS DIRIGIDOS A LA IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA HACIA LA COCAÍNA

En las últimas décadas se han realizado grandes avances en el conocimiento de las bases neurobiológicas de la adicción (*Slaker y cols., 2016*). La dopamina es la molécula más relevante del sistema de recompensa y gratificación cerebral (*Schultz, 2002; España y Jones, 2013*). Una de las hipótesis más respaldadas para explicar la adicción desde el punto de vista neurobiológico señala a la dopamina como el neurotransmisor clave en el comportamiento adictivo. Uno de los principales defensores de esta hipótesis es el profesor Di-Chiara y su equipo quienes señalan que los opiáceos, el alcohol, la nicotina, las anfetaminas y la cocaína aumentan los niveles extracelulares de dopamina en regiones límbicas, en especial en el núcleo *accumbens* (*Di-Chiara, 1995; Carboni y cols., 2000*). El incremento en la actividad del sistema dopaminérgico de recompensa, puede significar el inicio del proceso adictivo en individuos vulnerables (*Nestler y Aghajanian, 1997*) y aunque no se entienden completamente los mecanismos por los cuales el consumo de cocaína genera adaptaciones cerebrales que originan un estado de dependencia en el individuo, se sabe que se produce una sensibilización dopaminérgica, sobre todo cuando se consume de forma repetida e intermitente (*Carboni y cols., 2000; Pierce y Kalivas, 1997*).

A partir de ese momento, las proteínas implicadas en la ruta dopaminérgica despiertan un interés especial entre la comunidad científica y el receptor D₂ de dopamina, por su función y localización principalmente en regiones límbicas, es sin duda uno de los más estudiados (*Hurd y cols., 2001*). Surgen los primeros estudios que analizan la densidad de receptores D₂ en pacientes con problemas de adicción a drogas psicoestimulantes, como la cocaína (*Volkow y col, 1993; Martínez y cols., 2004*) y las anfetaminas (*Volkow y cols., 1999*) pero también con problemas de adicción a los opiáceos (*Wang y cols., 1997*) o al alcohol (*Martínez y cols., 2005; Heinz y cols., 2004*) revelando en todos los casos un menor número de receptores dopaminérgicos D₂ al ser comparados con la densidad encontrada en individuos normales. Estos datos sugieren que niveles bajos del receptor dopaminérgico D₂ están relacionados con una mayor susceptibilidad a la adicción de drogas de abuso.

Por esa razón, aunque existen muchos genes candidatos cuyos productos participan activamente en el sistema de recompensa, sin duda el gen *DRD2* (OMIM, 126450) que codifica para el receptor dopaminérgico D₂ es el más estudiado hasta el momento y a su vez el que registra los resultados más discutidos. Se valora si ciertas variantes polimórficas en el gen *DRD2* podrían influir de manera diferencial en la expresión de la proteína (*Gluskin y Mickey, 2016*), o modificar la susceptibilidad a la dependencia a sustancias psicoactivas (*Han y cols., 2008; Lohoff y cols., 2010; Fernández-Castillo y cols. 2010*). Una de las variantes más estudiadas es el polimorfismo rs1800497, conocido ampliamente como TaqIA (*Gluskin y Mickey, 2016*), se encuentra localizado muy cerca del extremo 3' del gen (*Arab y Elhawary, 2015*) y registra los datos más informativos sobre la implicación de este gen en la dependencia a drogas de abuso (*Noble, 2000; Neville y cols., 2004; Gluskin y Mickey, 2016*).

El primer estudio experimental que relaciona la actividad del receptor D₂ con el polimorfismo TaqIA revela una disminución en la función dopaminérgica cerebral de los individuos portadores del alelo A₁ al compararlos con individuos homocigotos para el alelo A₂ (*Noble y cols., 1993*). Otro estudio recurre a la autopsia de cerebros para informar de un descenso del 30–40% en la densidad de los receptores dopaminérgicos D₂ en el cuerpo estriado de aquellos individuos con el alelo A₁ que resulta estadísticamente significativo en el caudado ventral y en el putamen (*Thompson y cols., 1997*). Estudios realizados con individuos sanos utilizando tomografía por emisión de positrones detectan que el alelo A₁ está relacionado con un bajo potencial de unión de los receptores de dopamina D₂ lo que podría estar en consonancia con una disminución en la densidad del receptor (*Pohjalainen y cols., 1998*). El último metaanálisis realizado para estimar el efecto de las variantes genéticas sobre la densidad del receptor D₂ determina que el polimorfismo TaqIA influye fuertemente en la disponibilidad del receptor en el estriado (*Gluskin y Mickey, 2016*).

Los estudios de asociación han ido aumentando desde que el equipo liderado por Blum reveló un vínculo importante entre la variante TaqIA y el alcoholismo, especialmente el grave, encontrando el alelo A₁ en el 69% de alcohólicos graves frente al 20% de los no alcohólicos (*Blum y cols., 1990*).

En el año 2000, un metaanálisis realizado por Noble confirmó la importante asociación entre alcoholismo y el alelo A₁, con una frecuencia del doble para esta variante alélica entre alcohólicos y que llegaba al triple en los alcohólicos graves respecto a población no alcohólica (*Noble, 2000*).

Desde ese momento, le siguieron numerosos estudios de asociación en busca de relación de esta variable con las diversas sustancias que crean dependencia, algunos con resultados contradictorios (*Gelernter y cols. 1994; Fernández-Castillo y cols., 2010*). Sin embargo, varios estudios acumulan una fuerte evidencia que respalda la idea inicial (*Lawford y cols., 2000; Li y cols., 2004; Esposito-Smythers y cols., 2009; Chen y cols., 2011; Voisey y cols., 2012*).

Los resultados de estos estudios sugieren que la presencia del alelo A₁ está relacionada con una disfunción de los receptores D₂ por descenso en los niveles de expresión. Esta situación se traduce en una reducción de la eficiencia del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (*Cohen y cols., 2005*), lo que se ha denominado síndrome de déficit de recompensa (*Comings y Blum, 2000*), que promueve el consumo de sustancias que incrementan los niveles de dopamina cerebrales (*Khantzian, 1985*). En un esfuerzo por compensar las deficiencias del sistema dopaminérgico (*Blum y cols., 2008*), los consumidores de sustancias estarían estimulando los circuitos mesocorticolímbicos del cerebro, y a su vez, condicionando el estado de refuerzo y recompensa.

Esta variante se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos del gen *DRD2* (*Zhang y cols., 2007; Garrido y cols., 2011*), de ahí surge la idea de que el polimorfismo TaqIA no sea una variante funcional por sí misma sino que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante funcional propiamente dicha (*Hirvonen y cols., 2004*).

Durante muchos años se localizaba el polimorfismo TaqIA en el gen que codifica para el receptor D₂ de dopamina, pero recientemente se sabe que no se encuentra exactamente en este gen sino 10 Kb corriente abajo, en el exón 8 del gen vecino *ANKK1* (*Neville y cols., 2004; Klein y cols., 2007; Lucht y Rooskopf, 2008*). Por tanto, para una comprensión más amplia del fenómeno genético que supone la asociación de TaqIA con las adicciones es necesario evaluar el polimorfismo dentro de un contexto genético que incluye un grupo de genes adyacentes: *NCAMI-TTC12-ANKK1-DRD2*. Dentro de esta región hemos seleccionado y genotipado siete variantes polimórficas para analizar su significancia estadística en relación con la dependencia a la cocaína.

5.3. POLIMORFISMOS CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA

5.3.1. Relación con el gen ANKK1

El gen *ANKK1* (OMIM, 608774) contiene 8 exones y se encuentra a menos de 10 Kb corriente a bajo del gen *DRD2*, codifica una proteína de 765 aminoácidos con actividad de serina treonina quinasa (Neville y cols., 2004) denominada ANKK1 (*Ankyrin repeat and kinase domain containing 1*). Esta proteína citoplasmática se encontró también en el núcleo (Garrido y cols., 2011) y como su nombre indica, cuenta con un dominio quinasa y 12 repeticiones anquirinas para desempeñar diversas funciones celulares (Suchaneka y cols., 2011), muchas de ellas relacionadas con la mediación de la respuesta a los estímulos externos (Hanks y Hunter, 1995). Se ha relacionado con rutas de transducción de señal en el sistema dopaminérgico (Garrido y cols., 2011) y con los mecanismos que median en la atención en la circunvolución del cíngulo anterior, una región del cerebro muy rica en dopamina (Fossella y cols., 2006).

5.3.1.1. EL POLIMORFISMO TAQIA SE ASOCIA CON LA DEPENDENCIA A COCAÍNA

El análisis estadístico de asociación, refleja una clara significación estadística entre casos y controles ($p=0.033$), demostrando que el alelo A_1 está relacionado con la enfermedad cuando se encuentra en doble dosis. Estos resultados respaldan los ya descritos para población caucásica (Noble y cols., 1993), donde destaca una prevalencia muy superior del alelo A_1 en pacientes con dependencia a la cocaína (50.9%). En contraposición, sólo el 16% de los individuos que integran el grupo control, identificado por no mostrar ningún tipo de adicción, son portadores del alelo A_1 . El modelo de herencia escogido en su estudio se relaciona con un modelo dominante en el que se supone que una única copia del alelo A_1 es suficiente para modificar el riesgo y ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud, de manera que tanto los heterocigotos como los homocigotos para A_1 tienen el mismo efecto en el fenotipo. Por el contrario, el mismo modelo de herencia es elegido por grupos independientes encaminados a reproducir la relación existente entre el alelo A_1 de TaqIA y el consumo de cocaína en población de ascendencia africana (Lohoff y cols., 2010) e incluso en población española (Fernández-Castillo y cols., 2010), sin ningún éxito.

En una clara diferencia, los resultados derivados de nuestro estudio sugieren que el modelo de herencia que mejor se ajusta a la transmisión de esta variante es el modelo recesivo ya que el genotipo heterocigoto se halla igualmente representado en ambos grupos, sin embargo el grupo formado por los pacientes representa el genotipo homocigoto A_1/A_1 con una frecuencia superior al 10% sobre el grupo control. En un modelo de herencia recesivo las dos copias del alelo A_1 son necesarias para modificar el riesgo. Hasta el momento, las publicaciones registradas sobre el consumo de sustancias psicoactivas incluyen sólo dos genotipos vinculados a la presencia/ausencia del alelo A_1 . Este hecho podría explicar las discrepancias recogidas en la literatura científica en relación a este polimorfismo. Otros posibles planteamientos que explicarían las diferencias en las frecuencias observadas entre poblaciones aluden a sesgos en la selección de las muestras, ya sea por estratificación o por una elección poco precisa de los individuos que formarán los dos grupos a estudio: casos y controles. Además hay que tener en cuenta que tanto el policonsumo como la patología dual dificultan la interpretación final de los resultados.

El cambio nucleotídico en TaqIA de una guanina por una adenina en el exón 8 del gen (c.2137G>A), provoca a su vez un cambio de un glutámico por una lisina en el aminoácido que ocupa la posición 713 en la cadena polipeptídica (Glu713Lys). Esta modificación, de un aminoácido ácido por otro básico se localiza en la undécima repetición anquirina de la proteína ANKK1 (aminoácidos 691-720) y provoca importantes modificaciones en las propiedades físico-químicas de la proteína. Se podría interpretar, que el nuevo aminoácido introduce cambios en la acidez y tamaño que impedirían ciertas interacciones esenciales para estabilizar la estructura de la enzima y podría afectar a la especificidad en la unión de sustrato (*Michaely y cols., 2002; Neville y cols., 2004*).

El análisis computacional de este polimorfismo no predice cambios importantes en la estructura de la proteína ANKK1, aunque parece modificar las dianas de reconocimiento de las proteínas implicadas en el procesamiento del ARNm, adquiriendo un papel importante en los mecanismos postranscripcionales que condicionan la función final de la proteína. Así pues, parece que el cambio de base podría provocar a su vez un incremento y ganancia del sitio 5' o donador, generando una nueva señal para el procesamiento que estaría directamente relacionada con la pérdida de la penúltima repetición anquirina de la proteína y probablemente también de la última.

5.3.1.2. LOS POLIMORFISMOS RS4938012 Y RS4938013 SE ASOCIAN CON LA DEPENDENCIA A LA COCAÍNA

Los polimorfismos rs4938012 y rs4938013 están estrechamente ligados, segregan juntos y se comportan como si de uno sólo se tratase. El polimorfismo rs4938012 (c.185+863A>G) se localiza en la primera de las regiones intrónicas y el polimorfismo rs4938013 en el segundo exón del gen *ANKK1*. El cambio nucleotídico definido en rs4938013 (c.453A>C) no modifica el aminoácido de la posición 151 en el dominio quinasa de la proteína (aminoácidos 22-289), que continúa siendo una Isoleucina. A pesar de no alterar directamente la secuencia de aminoácidos, ambos marcadores acumulan una fuerte significación estadística de asociación con nicotina, alcohol y heroína (Gelernter y cols., 2006; Dick y cols., 2007; Nelson y cols., 2013) en población americana de origen africano, europeo y en población australiana.

Los resultados de nuestro estudio sugieren para las dos variantes una moderada asociación estadística ($p=0.04$) con la dependencia a la cocaína, semejante a la observada en otras sustancias psicoactivas (Nelson y cols., 2013). El modelo de herencia que mejor se ajusta a los resultados es el recesivo, proponiendo que son indispensables las dos copias del alelo marcador para modificar el riesgo. El análisis in silico de la variante exónica, no le atribuye funciones determinantes en la estructura de la proteína ANKK1, clasificándola de neutra y tolerada. No obstante, predice una modificación del procesamiento del ARNm al alterar los sitios de unión de proteínas SR. Estas dos características son compatibles, pues aunque el cambio nucleotídico no conlleve una variación de la secuencia aminoacídica y por tanto la estructura de la proteína no se ve afectada, puede generar modificaciones en las dianas reconocidas por las proteínas implicadas en el proceso postranscripcional.

Se sabe que existen secuencias localizadas en intrones y exones que pueden modular el reconocimiento de los sitios de splicing del ARN mensajero, facilitando o impidiendo la unión de los componentes del complejo ribonucleoproteico (Faustino y cols., 2003; Cooper y cols., 2009). Aunque no se ha corroborado la implicación de estos dos polimorfismos en la alteración del patrón normal de procesamiento del ARNm, no se descarta que se encuentren en desequilibrio de ligamento con otro polimorfismo funcional en el que resida la relación causa-efecto o incluso que rs4938013 sea un polimorfismo funcional al estar localizado en el dominio fundamental para la actividad quinasa de la proteína. Son necesarios estudios funcionales para validar nuestros resultados.

5.3.2. Relación con el gen *TTC12*

El gen *TTC12* (OMIM, 610732) está localizado entre los genes *NCAMI* y *ANKK1*, se expande 69 Kb y contiene 22 exones. Codifica para una proteína citoplasmática llamada TPARM de 705 aminoácidos que incluye un dominio de repetición tetratricopéptido (TPR) y 3 dominios con repeticiones armadillo (ARM) (Katoh y Katoh, 2003) que parece estar implicada en la vía de transmisión dopaminérgica y en el desarrollo neuronal mediante la ruta de señalización Wnt (Castelo-Branco y Arenas, 2006).

5.3.2.1. EL POLIMORFISMO RS2303380 SE ASOCIAN CON LA DEPENDENCIA A COCAÍNA

Este marcador se localiza en la región intrónica del gen *TTC12*, concretamente en el intrón 7 a tan solo 8 bases del exón 7 (c.504+8G>A). Este hecho suma importancia, si se tiene en cuenta que las secuencias consenso de splicing son reconocidas por un complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas encargadas de iniciar el proceso de eliminación de intrones en el ARN mensajero para que la expresión génica resulte con éxito. Se ha estimado que alrededor del 15% de las enfermedades hereditarias tienen su origen en la alteración de las secuencias necesarias para distinguir las fronteras entre los exones e intrones (Faustino y cols., 2003; Cooper y cols., 2009; Singh y Cooper, 2012). El polimorfismo rs2303380 se localiza cerca del lugar de *splicing*. Por tanto, el cambio de una A por una G en la secuencia original puede originar un ARN mensajero con alteraciones en la pauta de lectura que codificaría proteínas truncadas no funcionales. Para verificar esta hipótesis sería indispensable desarrollar estudios funcionales y de expresión de la proteína *TTC12*.

Según nuestros resultados, una moderada significación estadística ($p=0.046$) relaciona este marcador con la dependencia a cocaína, prácticamente la misma que la encontrada para otras sustancias psicoactivas como la heroína (Nelson y cols., 2013) y menor que la descrita para nicotina (Gelernter y cols., 2006).

5.4. POLIMORFISMOS SIN SIGNIFICACIÓN INDIVIDUAL

Los restantes marcadores estudiados no reflejan por sí solos una clara significación estadística, a pesar de provocar cambios en la estructura de la proteína.

El polimorfismo rs584427 se sitúa en el exón 12 del gen *NCAMI* y codifica para un aminoácido localizado en la región extracelular de la proteína. El cambio nucleotídico no conlleva ningún cambio en la secuencia de aminoácidos y los resultados de nuestro estudio no proyectan diferencias estadísticamente significativas. El análisis *in silico* le adjudica un efecto neutro y tolerado. Sin embargo, el programa informático ESE-finder predice que se genera un sitio de unión para la proteína SRSF1, que no se encuentra en la secuencia original, además de aumentar el número de áreas de reconocimiento para las proteínas SRSF1 (IgM) y SRSF5. Los estudios realizados por el equipo de Yang, le adjudican un efector protector al alelo menor cuando analizan la combinación de 3-4 SNP localizados en el exón 12 del gen *NCAMI* (Yang y cols., 2007).

El polimorfismo rs723077, localizado en el exón 3 del gen *TTC12*, provoca un cambio de aminoácido de una Metionina por una Leucina y por tanto se introduce un aminoácido apolar alifático donde existía un aminoácido apolar azufrado, en una región próxima al primer motivo tetratricopéptido. Todavía no se conoce con exactitud la estructura y la función de esta proteína y por consiguiente tampoco las repercusiones que podría tener este cambio en la conformación de la misma, pero parece que individualmente, ninguna relacionada con la adicción a cocaína. El análisis *in silico* de esta variante no revela ninguna repercusión para la estructura de la proteína, sin embargo el programa de predicción ESE-finder sugiere una modificación en las áreas de reconocimiento para proteínas SR, que podría suponer cambios en el procesamiento del ARNm y posterior traducción a proteína. El exón 3 del gen *TTC12* es una de las zonas propuestas por el grupo liderado por Yang, pues acumula una fuerte evidencia de asociación entre una combinación de polimorfismos y el alcoholismo, además de otras drogas (Yang y cols., 2007).

Finalmente, el polimorfismo rs11604671 localizado en el exón 6 del gen *ANKKI* produce un cambio de una glicina por una arginina cerca del dominio quinasa. Este cambio tan drástico de un aminoácido apolar, sin carga y de tamaño muy pequeño, por otro de carácter polar, con carga positiva y tamaño mayor, supone cambios en cuanto a polaridad, carga, hidrofobicidad y masa y podría modificar las propiedades físico-químicas de la proteína. Las herramientas computacionales utilizadas en nuestro estudio le atribuyen al cambio nucleotídico un efecto neutro o tolerado.

No obstante, parece que el número de dianas de reconocimiento para las proteínas SRSF1 y SRSF1 (IgM) aumentan y se genera un sitio 5' donador, todo ello podría alterar el procesamiento del ARNm. En la bibliografía consultada, esta variante parece no tener relevancia en la estructura de la proteína, pero en combinación con otras variantes genéticas proporciona importantes haplotipos de riesgo para nicotina (*Gelernter y cols., 2006*) y alcohol (*Yang y cols., 2008*).

5.5. RELACIÓN DE CONSUMO DE COCAÍNA CON LA REGIÓN NTAD

Cuando estudiamos una región concreta del cromosoma mediante una combinación de polimorfismos, analizamos haplotipos. Esta perspectiva es la más correcta cuando se trabaja con enfermedades complejas como es el caso de la dependencia hacia la cocaína, pues otorga una mejor comprensión sobre como el componente genético predispone al desarrollo de la enfermedad (*Pierce, 2015*).

La región NTAD comprende el grupo de genes que codifican para las proteínas NCAM1, TCC12, ANKK1 y DRD2, todas ellas con funciones a nivel de la transmisión neuronal, lo que la convierte en una región atractiva para el estudio de las drogodependencias (*Gelernter y col. 2006*). Los primeros estudios que analizan esta región son los reportados por el grupo de Gelernter en busca de asociación con la dependencia a la nicotina y le atribuyen un *LOD score* de 1'97. Genotipan 43 SNP y seleccionan cuatro de ellos por ser los más significativos, uno en el gen *TTC12* (rs2303380) y tres en el gen *ANKK1* (rs4938012-rs4938015-rs11604671), posteriormente estudian las frecuencias del haplotipo (rs2303380-rs4938012-rs4938015-rs11604671) y encuentran relación con la dependencia a la nicotina en dos muestras de diferentes de población americana (*Gelernter y col. 2006*). Son los primeros en definir un haplotipo de riesgo y un haplotipo protector y lo localizan en el gen *ANKK1*. Al año siguiente realizan un estudio más robusto en muestras de alcohólicos observando las diferentes formas combinatorias que adquieren 43 SNP localizados a lo largo de la región NTAD. Le asignan a 4 subregiones toda la responsabilidad genética con una fuerte carga estadística, el exón 12/intrón 13 del gen *NCAM1*, el exón 3 del gen *TTC12* y los exones 2 y 5 del gen *ANKK1* (*Yang y cols., 2007*). Otro grupo independiente concentra en el extremo 5' del gen *ANKK1* toda evidencia (*Dick y cols., 2007*).

De acuerdo al conocimiento científico actual, todos los resultados coinciden en relacionar esta región con un mayor riesgo de dependencia a las distintas drogas de abuso: alcohol (*Yang y cols., 2007*), nicotina (*Gelernter y cols., 2006*) y opiáceos (*Nelson y cols., 2013*). Sin embargo a día de hoy, no existe información sobre estudios que relacionen la región NTAD con la cocaína, por eso decidimos investigar sobre este tema.

En nuestro trabajo se detecta una relación entre las variantes alélicas de la región NTAD y la dependencia hacia la cocaína. Asimismo, los resultados obtenidos coinciden con la información registrada para otras sustancias adictivas y depositan la carga estadística en la región comprendida entre los genes *TTC12* y *ANKK1* (*Gelernter y cols., 2006; Dick y cols., 2007*). Si nos adentramos en profundidad, en esta región se sitúan los cuatro SNP con significación estadística individual (rs2303380, rs4938012, rs4938013, rs1800497) y que en conjunto, con el resto de SNP genotipados, definen un haplotipo de riesgo (CAAGCGC) que se revalida cuando se incluye en el análisis solo a los pacientes dependientes de sexo masculino o cuando se excluye a aquellos que consumen varias sustancias.

Todavía no se conoce con exactitud las funciones de estas dos proteínas ni las rutas e interacciones en las que pueden estar implicadas, por tanto se necesitan más estudios que ayuden a aclarar la función específica de estas proteínas, así como estudios funcionales de los polimorfismos significantes. No obstante, la información alcanzada en los últimos años sugiere que estas proteínas pueden estar vinculadas con la ruta dopaminérgica (*Hoienicka y cols., 2010; Garrido y cols., 2011; Ponce y cols., 2016*) y por consiguiente, su expresión interfiere en la vía de recompensa cerebral, involucrada a su vez en el mantenimiento del trastorno aditivo (*Corominas y cols., 2007*).

Se conoce que el consumo compulsivo de la cocaína así como los fenómenos de recaída son consecuencia de neuroadaptaciones en la vía mesolímbica que provocan hipersensibilidad a las señales relacionadas con la droga (*Hollander y cols., 2010*). Además, el consumo crónico se acompaña de una disminución de la función dopaminérgica con desarrollo de cambios neuroadaptativos en las vías mesolímbicas y mesocorticales (*Ersche y cols., 2011*). Sería por tanto posible que ambas proteínas *TTC12* y *ANKK1* estuviesen implicadas directa o indirectamente en estos fenómenos de neuroplasticidad cerebral, lo que explicaría la asociación con el proceso aditivo.

Los genes que comprenden la región NTAD constituyen un bloque genético muy conservado a lo largo de la evolución para preservar el mecanismo de co-regulación y consecuentemente la integridad del fenotipo (*Mota y cols., 2012*). De manera que un polimorfismo en un gen podría afectar indirectamente los niveles de expresión de los genes vecinos. Se ha demostrado que el marcador rs2734849 que comparte exón con rs1800497 (TaqIA) en el gen *ANKK1*, modifica los niveles de expresión de los genes regulados por un factor de transcripción denominado NF-κB (*Nuclear Factor-kappaB*) (*Huang y cols., 2009*), al que se le atribuye una función citoprotectora (*Lawrence, 2009*), aunque también se asocia con un papel pro-apoptótico dependiendo del estímulo y del contexto celular (*Baldwin, 1996*). Este factor de transcripción se encuentra en su forma inactiva en todas las células y su activación involucra la regulación de una gran variedad de genes, entre ellos los cuatro genes incluidos en la región NTAD (*Mota y cols., 2012*) y por consiguiente, la expresión de las proteínas codificadas por estos cuatro genes (*NCAMI, TTC12, ANKK1, DRD2*) constituyendo un nexo de unión común. Si se asume que la expresión del gen *DRD2* está regulada por dicho factor de transcripción (*Fiorentini y cols., 2002; Bontempi y cols., 2007*), el gen *ANKK1* estaría regulando indirectamente al gen que codifica para el receptor D₂ de dopamina y por tanto, modificando los niveles de expresión de esta proteína (*Suchaneka y cols., 2011*).

Si tenemos presente que una disminución en la densidad de receptores dopaminérgicos D₂ está vinculada con la expresión del factor de transcripción NF-κB y que a su vez, para compensar la disfunción del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (*Cohen y cols., 2005*), se promueve el consumo de sustancias que incrementan los niveles de dopamina cerebrales (*Blum y cols., 2008*), la disminución del factor de transcripción podría estar implicado en el proceso adictivo. Además este hecho suma importancia al conocer que durante el consumo crónico se produce cambios neuroadaptativos en el sistema dopaminérgico mesocortical. Se sabe que un desequilibrio entre los receptores D₁ y D₂ en el córtex prefrontal favorece la actividad de tipo D₁ en detrimento de la actividad propia de los receptores D₂ (*Bowers y cols., 2004*) con un predominio de las funciones inhibitorias. Como consecuencia, sólo los estímulos más fuertes pueden provocar la liberación de la dopamina necesaria para activar el córtex prefrontal y sobrepasar la inhibición producida por el predominio de la activación de los receptores D₁ (*Lewis y O'Donnell, 2000; Kalivas y cols., 2005*). Por tanto, la sensibilización de los receptores D₁ quedaría compensada con la regulación a la baja de de los receptores D₂ y, posiblemente también, por la co-existencia de una expresión disminuida de dichos receptores, genéticamente determinada, que podría actuar como factor definitivo en la conducta adictiva (*Corominas y cols., 2007*).

En definitiva, parece que el gen *ANKK1* regula la expresión del factor de transcripción NF- κ B que a su vez regula la expresión de receptores dopaminérgicos D₂, cuya disminución también genéticamente determinada puede significar el inicio del proceso adictivo y la consolidación por mecanismos de neuroadaptación en individuos vulnerables.

6. CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos rs2303380, rs4938012, rs4938013, rs1800497 localizados en una región muy conservada del cromosoma 11 que codifica para proteínas con funciones en el sistema de recompensa cerebral están asociados con un riesgo aumentado a desarrollar dependencia hacia la cocaína.
2. La combinación de siete SNP (rs584427-rs723077-rs2303380-rs4938012 rs4938013-rs11604671-rs1800497) permite definir un haplotipo de riesgo (C-A-A-G-C-G-C) que se repite tanto en pacientes que consumen solo cocaína, como en pacientes que consumen además de la cocaína, otras drogas.
3. La región NTAD, liderada por los genes TTC12 y ANKK1, supone una predisposición genética a generar adicción ante cualquier tipo de droga de abuso.
4. El sexo del individuo no representa una variable dependiente en el desarrollo del proceso adictivo, no se observan diferencias genéticas en la región estudiada entre hombres y mujeres. Cualquier diferencia encontrada en las frecuencias poblacionales se explicará por factores psico-sociales.

7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS

- Ackerman JM, White FJ. Decreased activity of rat A10 dopamine neurons following withdrawal from repeated cocaine. *Eur J Pharmacol.* 1992;218:171-3.
- Acquas E, Di Chiara G. Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem.* 1992;58(5):1620-5.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9
- Alburges ME, Narang N, Wamsley JK. Alterations in the dopaminergic receptor system after chronic administration of cocaine. *Synapse.* 1993;14:314-23.
- Altman J, Everitt BJ, Glautier S, Markou A, Nutt D, Oretti R, Phillips GD, Robbins TW. The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology.* 1996;125:285-345.
- Arab AH, Elhawary NA. Association between ANKK1 (rs1800497) and LTA (rs909253) Genetic Variants and Risk of Schizophrenia. *Biomed Res Int.* 2015;2015:821827.
- Araos P, Vergara-Moragues E, Pedraz M, Pavón FJ, Campos Cloute R, Calado M, Ruiz JJ, García-Marchena N, Gornemann I, Torrens M, Rodríguez de Fonseca F. Comorbilidad psicopatológica en consumidores de cocaína en tratamiento ambulatorio. *Adicciones.* 2014;26(1):15-26.
- Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med.* 2010;3:24.
- Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M. A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 1997;6:577-582.
- Asociación Psiquiátrica Americana (APA). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV). 4ª ed. Barcelona: Masson; 1995. Disponible en: <http://www.mdp.edu.ar/psicologia/cendoc/archivos/Dsm-IV.Castellano.1995.pdf>
- Asociación Psiquiátrica Americana (APA). Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5). 5ª ed. Madrid: Panamericana; 2014
- Balcells, M. Complicaciones orgánicas de la cocaína. *Adicciones.* 2001;13(2),167-77.
- Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
- Barreto IF. The use of coca leaves in traditional communities: perspectives in health, society, and culture. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2013;20(2):627-41.

REFERENCIAS

- Barreto-Valer K, López-Bellido R, Macho Sánchez-Simón F, Rodríguez RE. Modulation by cocaine of dopamine receptors through miRNA-133b in zebrafish embryos. *PLoS One*. 2012;7(12):e52701.
- Bataller R. Drogas de abuso. En: Bataller R. Toxicología clínica. 1ª ed. Valencia: Universitat de Valencia; 2004.
- Beck, AT. Terapia cognitiva de las drogodependencias. 1ª ed. Madrid: Pirámide; 2000.
- Becoña, E. Los adolescentes y el consumo de drogas. *Papeles del psicólogo*. 2000;77:25-32.
- Benevento M, van de Molengraft M, van Westen R, van Bokhoven H, Kasri NN. The role of chromatin repressive marks in cognition and disease: A focus on the repressive complex GLP/G9a. *Neurobiol Learn Mem*. 2015;124:88-96.
- Berglind WJ, Case JM, Parker MP, Fuchs RA, See RE. Dopamine D1 or D2 receptor antagonism within the basolateral amygdala differentially alters the acquisition of cocaine-cue associations necessary for cue-induced reinstatement of cocaine-seeking. *Neuroscience* 2006;137(2):699-706
- Blum K, Chen AL, Braverman ER, Comings DE, Chen TJ, Arcuri V, Blum SH, Downs BW, Waite RL, Notaro A, Lubar J, Williams L, Prihoda TJ, Palomo T, Oscar-Berman M. Attention-deficit-hyperactivity disorder and reward deficiency syndrome. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4(5):893-918.
- Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggs AH, Cohn JB. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA*. 1990;263:2055-2060
- Bontempi S, Fiorentini C, Busi C, Guerra N, Spano P, Missale C. Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. *Endocrinology*. 2007;148(5):2563-70.
- Bowers MS, McFarland K, Lake RW, Peterson YK, Lapish CC, Gregory ML, Lanier SM, Kalivas PW. Activator of G protein signaling 3: A gatekeeper of cocaine sensitization and drug seeking. *Neuron*. 2004;42(2):269-81.
- Bühler KM, 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;20(5):845-71.
- Burillo-Putze G, Borreguero León JM, Vallbona Afonso E, de Vera González AM, Fernández Rodríguez JF, García Dopico JA. Consumo de cocaína y su relación con patología cardiaca y traumática atendida en un servicio de urgencias. *Emergencias*. 2008;20:380-4.
- Caballero L. Tratamientos psicofarmacológicos en la adicción a la cocaína. *Psiquiatría Pública*. 1991;3(1):9-18.

REFERENCIAS

- Caballero L. Adicción a cocaína: Neurobiología, clínica, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas; 2005
- Calafat A, Juan M, Fernández C, Gil E, Llopis JJ. La vida social de la cocaína. *Adicciones*. 2001;13(2):61-103
- Calipari ES, Bagot RC, Purushothaman I, Davidson TJ, Yorgason JT, Peña CJ, Walker DM, Pirpinias ST, Guise KG, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Nestler EJ. In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(10):2726-31
- Cambon, K, Hansen SM, Venero C, Herrero AI, Skibo G, Berezin V, Bock E, Sandi C. A synthetic neural cell adhesion molecule mimetic peptide promotes synaptogenesis, enhances presynaptic function, and facilitates memory consolidation. *J. Neurosci*. 2004;24:4197-4204.
- Carboni E, Rolando MT, Silvagani A, Di Chiara G. Increase of dialysate dopamine in the bed nucleus of stria terminalis by clozapine and related neuroleptics. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22:140-7.
- Carlborg O, Haley CS. Epistasis: too often neglected in complex trait studies. *Nat Rev Genet*. 2004;5:618–625
- Carracedo A. Hablemos de el proyecto HapMap. *GH Continuada*. 2007;6(4):201-203.
- Carroll KM, Fenton LR, Ball SA, Nich C, Frankforter TL, Shi J, Rounsaville BJ. Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in coca dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(3):264-72.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3568-71.
- Casale JF, Mallette JR, Jones LM. Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production. *Forensic Sci Int*. 2014;237:30-9.
- Castaño G. Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*. 2000;12:541-550.
- Castelo-Branco G, Arenas E. Function of Wnts in dopaminergic neuron development. *Neurodegener Dis*. 2006;3:5-11.
- Cavallotti C, Frati A, Cavallotti D, Tranquilli Fm. Dopaminergic Receptors In Rat Dura Mater: Pharmacological Characteristics. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(3):190-4.
- Ciccocioppo R, Sanna PP, Weiss F. Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1976-81.

REFERENCIAS

- Chen D, Liu F, Shang Q, Song X, Miao X, Wang Z. Association between polymorphisms of DRD2 and DRD4 and opioid dependence: evidence from the current studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156B(6):661-70.
- Cohen MX, Young J, Baek JM, Kessler C, Ranganath C. Individual differences in extraversion and dopamine genetics predict neural reward responses. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2005;25:851-861
- Comings DE, Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res.* 2000;126:325-41.
- Comings DE, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Rugle LJ, Muhleman D, Chiu C. A study of the dopamine D2 receptor gene in pathological gambling. *Pharmacogenetics.* 1996;6(3):223-34.
- Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell.* 2009;136(4):777-93.
- Corominas M, Roncero C, Bruguera E, Casas M. Sistema dopaminérgico y adicciones. *Rev Neurol.* 2007;44(1):23-31
- Crabbe JC, Belknap JK, Buck KJ. Genetic animal models alcohol and drug abuse. *Science* 1994;264:1715-23.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 1987; 236:799-806.
- Damez-Werno D, LaPlant Q, Sun H, Scobie K, Dietz D, Walker IM, Koo JW, Vialou VF, Mouzon E, Russo SJ, Nestler EJ. Drug experience epigenetically primes Fosb gene inducibility in rat nucleus accumbens. *J Neurosci.* 2012;32(30),10267-72.
- De Murcia G, Shall S. In *From DNA Damage and Stress Signaling to Cell Death: Poly ADP-Ribosylation Reactions.* 1^{ed}. New York: Oxford University Press; 2000.
- Dhir A, Buratti E, Van Santen MA, Lührmann R, Baralle FE. The intronic splicing code: multiple factors involved in ATM pseudoexon definition. *EMBO J.* 2010;29(4):749-760.
- Diana M, Pistis M, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7966-9.
- Díaz A, Barruti M, Doncel C. Les línees de l'èxit. Estudi sobre la naturalesa i extensió del consum de cocaïna a Barcelona. Ajuntament Barcelona: Lab. Sociologia. ICESB. 1992.
- Di-Chiara G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend.* 1995;38:95-137.

REFERENCIAS

- Dick DM, Wang JC, Plunkett J, et al. Family-based association analyses of alcohol dependence phenotypes across DRD2 and neighboring gene ANKK1. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31:1645–53.
- Djouma E, Lawrence AJ. The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:551-9.
- Docimo T, Schmidt GW, Luck K, Delaney SK, D'Auria JC. Selection and validation of reference genes for quantitative gene expression studies in *Erythroxylum coca*. *F1000Res.* 2013;2:37
- Drgon T, Zhang PW, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M, Uhl GR. Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS One.* 2010;5:e8832.
- Dueñas A. Intoxicaciones agudas en medicina de urgencia y cuidados críticos. 1ªed. Barcelona: Masson; 1999.
- Dziejicka-Wasylewska M, Faron-Grecka A, Andrecka J. Fluorescence Studies Reveal Heterodimerization of Dopamine D1 and D2 Receptors in the Plasma Membrane. *Biochemistry.* 2006;45(29):8751-9.
- Ebstein RP, Belmaker RH. Saga of an adventure gene: novelty seeking, substance abuse and the dopamine D4 receptor (D4DR) exon III repeat polymorphism. *Mol Psychiatry.* 1997;2(5):381-4.
- EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Informe Europeo sobre drogas. El problema de la drogodependencia en Europa. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Unión Europea, 2009. Disponible en:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_93236_ES_EMCCDDA_AR2009_ES.pdf
- EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Informe Europeo sobre drogas.Tendencias y novedades. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Unión Europea, 2015. Disponible en:
http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_239505_ES_TDAT15001ESN.pdf
- Ernst M, Luciana M. Neuroimaging of the dopamine/reward system in adolescent drug use. *CNS Spectr.* 2015;20(4):427-41.
- Ersche KD, Barnes A, Simon Jones P, Morein-Zamir S, Robbins TW, Bullmore ET. Abnormal structure of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity and compulsivity in cocaine dependence. *Brain.* 2011;134(7):2013–24.
- España RA, Jones SR. Presynaptic dopamine modulation by stimulant self administration. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013;5:261–76.

REFERENCIAS

- Esposito-Smythers C, Spirito A, Rizzo C, McGeary JE, Knopik VS. Associations of the DRD2 TaqIA polymorphism with impulsivity and substance use: preliminary results from a clinical sample of adolescents. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;93(3):306-12.
- Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003;17(4):419-37.
- Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *J Appl Toxicol.* 2015;35(4):418-25
- Fernández-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B, Cormand B. Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet.* 2010;20(6):317-20
- Fernández-Espejo E. Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Rev Neurol.* 2002;34:659-64
- Fiorentini C, Guerra N, Facchetti M, Finardi A, Tiberio L, Schiaffonati L, Spano P, Missale C. Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol.* 2002;16(2):353-66.
- Flores, A. Efectos de la cocaína en el ser humano. *Trastornos adictivos.* 2008;10(3),151-65.
- 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;6:71-78.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002;296(5576):2225-9.
- García del Castillo JA, López Sánchez C. Manual de estudios sobre la cocaína y drogas de síntesis. 1ªed. Madrid: Edaf; 2005.
- García Jiménez. JM. La droga: conceptos, aspectos legales y penitenciarios. 1ªed. Alicante: Club Universitario; 2001.
- García-Rodríguez O. Tratamiento conductual de la adicción a la cocaína. *Trastornos adictivos.* 2008;10(4):242-51
- Garrido E, Palomo T, Ponce G, García-Consuegra I, Jiménez-Arriero MA, Hoenicka J. The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. *Neurotox Res.* 2011;20(1):32-9.
- Gelernter J, Pauls DL, Leckman J, Kidd KK, Kurlan R. D2 dopamine receptor alleles do not influence severity of Tourette's syndrome. Results from four large kindreds. *Arch Neurol.* 1994;51:397-400

REFERENCIAS

- Gelernter J, Sherva R, Koesterer R, Almasy L, Zhao H, Kranzler HR, Farrer L. Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry*. 2014;19:717–23.
- Gelernter J, Yu Y, Weiss R, Brady K, Panhuysen C, Yang BZ, Kranzler HR, Farrer L. Haplotype spanning TTC12 and ANKK1, flanked by the DRD2 and NCAM1 loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Hum. Mol. Genet*. 2006;15:3498–507.
- Glawin F, Kleber H. Pharmacologic treatments of cocaine abuse. *Psychiatr Clin North Am*. 1986;9(3):573-83.
- Gluskin BS, Mickey BJ. Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: a systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies. *Transl Psychiatry*. 2016;6:e747.
- Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The Genetics of Addictions: Uncovering the genes. *Nat Rev Genet*. 2005;6(7):521-32.
- González AA, Matute E. *Cerebro y Drogas*. 1ªed. México: Manual Moderno; 2013.
- González M.C. Uso recreativo de la cocaína, de la diversión a la adicción. *Offarm*. 2009;28(1):60-6.
- Goodman J, Packard MG. Memory Systems and the Addicted Brain. *Front Psychiatry*. 2016;7:24.
- Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet*. 1993;2(12):2197.
- Guardia J, Catafau AM, Batlle F, Martín JC, Segura L, Gonzalvo B. Striatal dopaminergic D(2) receptor density measured by [(123)I] iodobenzamide SPECT in the prediction of treatment outcome of alcohol- dependent patients. *Am J Psychiatry*. 2000;157(1):127-9.
- Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med*. 2002;347(19):1512-20.
- Halpern JH, Sholar MB, Glowacki J, Mello NK, Mendelson JH, Siegel AJ. Diminished interleukin-6 response to proinflammatory challenge in men and women after intravenous cocaine administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1188-93.
- Han DH, Yoon SJ, Sung YH, Lee YS, Kee BS, Lyoo IK, Renshaw PF, Cho SC. A preliminary study: novelty seeking, frontal executive function, and dopamine receptor TaqIA gene polymorphism in patients with methamphetamine dependence. *Compr Psychiatry*. 2008;49(4):387-92.
- Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 1995;9(8):576–96.

- Haro G, Cervera G, Martínez-Raga J, Pérez-Gálvez B, Fernández-Garcés M, Sanjuan J. Pharmacological treatment of substance dependence from a neuroscientific perspective (I): opiates and cocaine. *Actas Esp Psiquiatr.* 2003;31(4):205-19.
- Hart CL, Jatlow P, Sevarino KA, McCance-Katz EF. Comparison of intravenous cocaethylene and cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 2000;149(2):153-62.
- Hauge X.Y, Grandy D.K, Eubanks J.H, Evans G.A, Civelli O, Litt M. Detection and characterization of additional DNA polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene. *Genomics.* 1991;10:527-30.
- Heinz A, Goldman D. Genotype effects on neurodegeneration and neuroadaptation in monoaminergic neurotransmitter systems. *Neurochem Int.* 2000;37(5-6):425-32.
- Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Buchholz HG, Grunder G, Kumakura Y. 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;162(8):1515-20.
- Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grusser SM. Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry.* 2004;161(10):1783-9.
- Henry DJ, Hu XT, White FJ. Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: relevance to cocaine sensitization. *Psychopharmacology* 1998;140(2):233-42.
- Henry DJ, White FJ. The persistence of behavioral sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci.* 1995;15(9):6287-99.
- Hildebrand BE, Nomikos GG, Hertel P, Schilström B, Svensson TH. Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res.* 1998;779:214-25.
- Hirvonen M, Laakso A, Nagren 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;9(12):1060-1
- Hoenicka J, Quiñones-Lombrana A, España-Serrano L, Alvira-Botero X, Kremer L, Pérez-González R, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero MA, Ponce G, Palomo T. The ANKK1 gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. *Biol Psychiatry.* 2010;67(1):3-11.

- Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, Willoughby D, Wahlestedt C, Conkright MD, Kenny PJ. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*. 2010;466(7303):197-202.
http://www.dipucadiz.es/export/sites/default/galeria_de_ficheros/drogodependencias/documentos/GUIA-ESTIMULANTES.pdf
- Hou S, Zhan M, Zheng X, Zhan CG, Zheng F. Kinetic characterization of human butyrylcholinesterase mutants for the hydrolysis of cocaethylene. *Biochem J*. 2014;460(3):447-57.
- Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Beuten J, Dupont RT, Inohara N and Li MD. Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(2):319-30.
- Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet*. 2005;6(4):287-98
- Hurd YL, Suzuki M, Sedvall GC. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *J. Chem. Neuroanat*. 2001;22,127-37.
- Ibáñez Cuadrado A. Genética de las adicciones. *Adicciones* 2008;20(2):103-9
- Iglesias Lepine ML, Echarte Pazos JL, Calpe Perarnau J, Mariñosa Marré M., Lloret Carbo J. Intoxicaciones agudas por drogas de abuso. 1ªed. Barcelona: Menarini; 2009
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológico. *Gac Sanit*. 2005;19(4):333-41
- International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96.
- International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
- Jönsson E.G, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall G.C. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry*. 1999;4(3):290-6.
- Juarez B, Han MH. Diversity of Dopaminergic Neural Circuits in Response to Drug Exposure. *Neuropsychopharmacology*. 2016
- Jufer RA, Walsh SL, Cone EJ. Cocaine and metabolite concentrations in plasma during repeated oral administration: development of a human laboratory model of chronic cocaine use. *J Anal Toxicol*. 1998; 22:435-44.
- Kalivas PW, Duffy P. Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem*. 1998;70:1497-502.

REFERENCIAS

- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron*. 2005;45:647-50.
- Kalivas PW. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict*. 2007;16:71-8.
- Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, Spratt K, Wierzbicki MR, Dackis C, O'Brien CP. A double blind, placebo controlled trial of modafinil for the treatment of cocaine dependence without comorbid alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*. 2015;155:105-10.
- Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of TPARM gene in silico. *Int. J. Oncol*. 2003;23(4):1213-7.
- Kaufmann CA, Johnson JE, Pardes H. Evolution and revolution in Psychiatric Genetics. En: Hall LL, Ed. *Genetics and Mental Illness. Evolving Issues for Research and Society*. New York: Plenum Press;1996
- Kenny PJ. Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014;16(3):335-44.
- Khantzian EJ. The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *Am J Psychiatry*. 1985;142(11):1259-64.
- Kinsey BM, Kosten TR, Orson FM. Active immunotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence. *Drugs Future*. 2010;35(4):301-306.
- Kleber HD. Pharmacologic treatments for heroin and cocaine dependence. *Am J Addict* 2003;12 Suppl 2: S5-S18
- Kleerup EC, Koyal SN, Marques-Magallanes JA, Goldman MD, Taskhin DP. Chronic and acute effects of "crack" cocaine on diffusing capacity, membrane diffusion, and pulmonary capillary blood volume in the lung. *Chest*. 2002;122(2):629-38.
- Klein TA, Neumann J, Reuter M, Hennig J, von Cramon DY, Ullsperger M. Genetically determined differences in learning from errors. *Science*. 2007;318(5856):1642-5.
- Koob, G.F. Cocaine reward and dopamine receptors: love at first site. *Arch Gen Psychiatry*. 1999;56(12):1107-8
- Kosten T, Domingo C, Orson F, Kinsey B. Vaccines against stimulants: cocaine and MA. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77(2):368-74
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
- Lacoste J, Delavenne-Garcia H, Charles-Nicolas A, Duarte Garcia F, Jehel L . Addiction to cocaine and other stimulants. *Presse Med*. 2012;41(12 Pt 1):1209-20.

- Ladero Quesada JM, Martín del Moral M. Complicaciones del consumo de cocaína: orgánicas y psiquiátricas. En: Lorenzo Fernández P. Drogodependencias. 3ªed. Madrid: Médica Panamericana; 1998:135-47.
- Lange R, Hillis D. Cardiovascular complications of cocaine use. *N Engl J Med*. 2001;345: 351-8.
- Lawford BR, Young RM, Noble EP, Sargent J, Rowell J, Shadforth S, Zhang X, Ritchie T. The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment. *Am J Med Genet*. 2000;96:592-8
- Lawrence T. The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651
- León J. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª ed. San José, Costa Rica: Agroamérica del ICCA; 2000
- Lewis BL, O'Donnell P. Ventral tegmental area afferents to the prefrontal cortex maintain membrane potential 'up' states in pyramidal neurons via D(1) dopamine receptors. *Cereb Cortex*. 2000;10:1168-75.
- Li MD, Ma JZ, Beuten J. Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behaviour. *Clin Genet*. 2004;66(5):382-92.
- Li CY, Mao X, Wei L. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol*. 2008; 4(1):e2.
- Li MD, Burmeister M. New insights into the genetics of addiction. *Nat Rev Genet*. 2009;10:225–31.
- Li Y, Zhu R, Wang W, Fu D, Hou J, Ji S, Chen B, Hu Z, Shao X, Yu X, Zhao Q, Zhang B, Du C, Bu Q, Hu C, Tang Y, Zhong L, Yang S, Zhao Y, Cen X. Arginine Methyltransferase 1 in the Nucleus Accumbens Regulates Behavioral Effects of Cocaine. *J Neurosci*. 2015;35(37):12890-2.
- Lima MS, Reisser AA, Soares BG, Farrell M. Antidepressants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(2):CD002950.
- Lizasoain, I., Moro, M.A. y Lorenzo, P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*. 2002;14(1),57-64.
- Llopis J. Dependencia, intoxicación aguda y síndrome de abstinencia por cocaína. *Adicciones*. 2001;13(2),147-166.
- Lograno DE, Matteo F, Trabucchi M, Govoni S, Cagiano R, Lacomba C, et al. Effects of chronic ethanol intake at a low dose on the rat brain dopaminergic system. *Alcohol* 1993;10(1):45-9.

REFERENCIAS

- Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Pettinati HM, Oslin DW, Dackis CA, O'Brien CP, Berrettini WH. Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:3078-84
- Lohoff FW, Bloch PJ, Hodge R, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Dackis CA, O'Brien CP, Pettinati HM, Oslin DW. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor and dopamine transporter genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett*. 2010;473(2):87-91
- Lorenzo Fernández P. Drogodependencias. Farmacología, patología, psicología, legislación. 3ª ed. Madrid: Panamericana; 2009
- Lucht M, Rosskopf D. Comment on Genetically determined differences in learning from errors. *Science*. 2008;321(5886):200
- Madrazo Z, Silvio-Estaba L, Secanella L, García-Barrasa A, Aranda H, Golda T, Biondo S, Rafecas A. Body packer: review and experience in a referral hospital. *Cir Esp*. 2007;82(3):139-45.
- Manetti L, Cavagnini F, Martino E, Ambrogio A. Effects of cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(8):701-8.
- Martínez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, et al. Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1190-202.
- Martínez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Pérez A. Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biol Psychiatry* 2005;58:779-86.
- May T, Juilfs F, Wolffgramm J. Long-lasting effects of chronic mu-opioid intake on the signal transmission via dopamine D1 receptors in the limbic forebrain of drug deprived rats. *Neuropharmacology* 1998;37:997-1006.
- McCreary AC, Müller CP, Filip M. Psychostimulants: Basic and Clinical Pharmacology. *Int Rev Neurobiol*. 2015;120:41-83.
- McDowell D, Nunes EV, Seracini AM, Rothenberg J, Vosburg SK, Ma GJ, Petkova E. Desipramine treatment of cocaine-dependent patients with depression: a placebo-controlled trial. *Drug Alcohol Depend*. 2005;80(2):209-21.
- McIntyre JC, Titlow WB and McClintock TS. Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons. *J Neurosci Res*. 2010;88:3243-56.
- Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, Laranjeira R, Vallada H. Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet*. 2005;15(3):171-4.

REFERENCIAS

- Michaely P, Tomchick DR, Machius M, Anderson RG. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J.* 2002;21:6387–96.
- Michalak P. Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes. *Genomics.* 2008;91:243-8.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Cocaína. Informes de la Comisión Clínica. Madrid: Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2007
- Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia Nacional sobre Drogas 2009-2016. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/pnsd/estrategiaNacional/docs/EstrategiaPNSD2009-2016.pdf>
- Miñarro López, J. Cocaína. *SEBBM.* 2012;172:8-12.
- Moreno G, Gamonal A, Del Pozo J. Guía para padres. Habla con ellos de la cocaína. Logroño: Gobierno de la Rioja. Plan Riojano de Drogodependencias y otras Adicciones; 2008.
- Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O. Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nat Neurosci.* 2002;5(2):169-74.
- Mota NR, Araujo-Jnr EV, Paixão-Côrtes VR, Bortolini MC, Bau CH. Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster. *Genet Mol Biol.* 2012;35(4):912-8. Roth Mota cambiar en texto
- Nakken S, Alseth I, Rognes T. Computational prediction of the effects of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Neurosciencie.* 2007;145(5):1273-9.
- Nelson EC, Lynskey MT, Heath AC, Wray N, Agrawal A, Shand FL, Henders AK, Wallace L, Todorov AA, Schrage AJ, Saccone NL, Madden PA, Degenhardt L, Martin NG, Montgomery GW. ANKK1, TTC12, and NCAM1 polymorphisms and heroin dependence: importance of considering drug exposure. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(3):325-33.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science.* 1997;278:58-63.
- Nestler EJ. Genes and adicction. *Nature Genetics.* 2000;26:277-281
- Nestler EJ. Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science.* 2001;292 (5525):2266-7.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004;24:165-2
- 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.
- Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001;11:863-74.

REFERENCIAS

- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
- NIDA (National Institute of Drug Abuse). La comorbilidad entre la adicción y otros trastornos mentales. NIDA InfoFacts. Instituto Nacional de la Salud. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos; 2011
- NIDA (National Institute of Drug Abuse). The Brain & the Actions of Cocaine, Opiates, and Marijuana. Instituto Nacional de la Salud. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos; 2007
- Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, Fitch RJ, Ozkaragoz T, Sheridan PJ, Anglin MD. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 1993; 33(3):271-85
- Noble EP. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry.* 2000;15(2):79-89.
- Noble KA. Local Anesthesia Toxicity and Lipid Rescue. *J Perianesth Nurs.* 2015;30(4):321-35
- Nogué Xarau S. Intoxicaciones agudas. Bases para el tratamiento en un servicio de urgencias. 1ªed. Barcelona:Menarini; 2010.
- OAD (Observatorio Aragonés de Drogodependencias). I Plan Autonómico sobre drogodependencias y otras conductas adictivas. Aragón 2005-2008
- OAD (Observatorio Aragonés de Drogodependencias). II Plan Autonómico sobre drogodependencias y otras conductas adictivas. Aragón 2010-2016
- Ochoa E. Cocaína y comorbilidad psiquiátrica. *Actas Esp Psiquiatr.* 2000;28(1):40-52
- OED (Observatorio Español sobre Drogas). Encuesta estatal sobre alcohol y drogas en España (EDADES). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. 2013 Disponible en: http://www.pnsd.mssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/EDADES_2013.pdf
- OED (Observatorio Español sobre Drogas). Encuesta estatal sobre el uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. 2014. Disponible en: http://www.pnsd.mssi.gob.es/profesionales/sistemaInformacion/pdf/2016_ESTUDES_2014-2015.pdf
- OED (Observatorio Español sobre Drogas). Informe sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. 2015. Disponible:

REFERENCIAS

- http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/catalogoPNSD/publicaciones/pdf/INFORME_2015.pdf
- Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, Mistro G, van den Boom D, y Jurinke C. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators Doc. No. 8876-006, R05 CO 070145; 2007
 - Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. En: Manual para el uso de los laboratorios nacionales de análisis de estupefacientes. Viena: Naciones Unidas; 2012. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_S.pdf
 - Ohno K y Masuda A. RNA Pathologies in Neurological Disorders. En: Blass, John P. editor. Neurochemical mechanisms in disease. Advances in Neurobiology. 1ª ed. New York: Springer; 2011. p.399-415
 - OMS (Organización Mundial de la Salud). Glosario de términos de alcohol y drogas. Madrid:Ministerio de Sanidad y Consumo; 2008.
 - Orson FM, Wang R, Brimijoin S, Kinsey BM, Singh RA, Ramakrishnan M, Wang HY, Kosten TR. The future potential for cocaine vaccines. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(9):1271-83
 - Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol.* 1997;11(2-3):121-42
 - Pierce BA. Genética: Un enfoque conceptual. 5ªed. Madrid: Panamericana; 2015
 - Pierce RC, Kalivas PW. Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci* 1997; 17(9): 3254-61
 - Platt JJ. Cocaine addiction: theory, research and treatment. Cambridge:Harvard University Press; 2000.
 - Pohjalainen T, Rinne JO, Nägren K, Lehtikoinen P, Anttila K, Syvälahti EK, Hietala J. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry.* 1998;3(3):256-60.
 - Ponce G, Quiñones-Lombrana A, Martín-Palanco NG, Rubio-Solsona E, Jiménez-Arriero MÁ, Palomo T, Hoenicka J. The Addiction-Related Gene Ankk1 is Oppositely Regulated by D1R- and D2R-Like Dopamine Receptors. *Neurotox Res.* 2016;29(3):345-50
 - Porta M. The genome sequence is a jazz score. *Int J Epidemiol.* 2003;32(1):29-31
 - Puelles L, Martínez S, Martínez M. Neuroanatomía. 1ªed. Madrid: Panamericana; 2008.
 - Ramoz N, Gorwood P. A genetic view of addiction. *Med Sci (Paris).* 2015(4):432-8.

REFERENCIAS

- Rao RB, Hoffman RS. Cocaine and Other Sympathomimetics. En: Marx JA, Hockberger RS, Walls RM, eds. Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice. 8ª ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2014.
- Riancho JA. Enfermedades complejas y análisis genéticos por el método GWAS. Ventajas y limitaciones. *Reumatol Clin.* 2012;8(2):56-7.
- Robinson AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Rev Neurosci.* 2011;12(11):623-37.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993;18(3): 247-91.
- Rocha BA. Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2003;479:107-115.
- Roncero J, Ramos JA, Collazos F, Casas M. Complicaciones psicóticas del consumo de cocaína. *Adicciones.* 2001;13(2),179-89.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol J., Stein LD. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001;409(6822):928-933.
- Sadakierska-Chudy A, Frankowska M, Miszkiel J, Wydra K, Jastrzębska J, Filip M. Prolonged Induction of miR-212/132 and REST Expression in Rat Striatum Following Cocaine Self-Administration. *Mol Neurobiol.* 2016
- Saiz Ruiz J, Ibáñez Cuadrado A. Genética molecular y Psiquiatría. Serie Nuevas fronteras en Psiquiatría. Barcelona: Ediciones Doyma; 1997.
- Sánchez L. Los jóvenes y la cocaína. Guía para no terminar rayados. Madrid: Consejería de Sanidad y Consumo. Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid; 2004.
- Sartor GC, Powell SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Epigenetic Readers of Lysine Acetylation Regulate Cocaine-Induced Plasticity. *J Neurosci.* 2015;35(45):15062-72.
- Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.* 2002;36(2):241-63
- Scobie KN, Damez-Werno D, Sun H, Shao N, Gancarz A, Panganiban CH, Dias C, Koo J, Caiafa P, Kaufman L, Neve RL, Dietz DM, Shen L, Nestler EJ. Essential role of poly(ADP-ribosyl)ation in cocaine action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(5):2005-10.
- Segura JA, Martín JM. Aspectos generales de los estimulantes. En: Guía Clínica para el tratamiento de los trastornos por el consumo de sustancias estimulantes. Junta de Andalucía: Consejería para la

Igualdad y Bienestar Social. Dirección General para las Drogodependencias y Adicciones; 2008.

Disponible en:

http://www.dipucadiz.es/export/sites/default/galeria_de_ficheros/drogodependencias/documentos/GUIA-ESTIMULANTES.pdf

- Sémon M and Duret L. Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. *Mol Biol Evol.* 2006;23(9):1715-23.
- SET (Sociedad Española de Toxicomanías). Tratado SET de trastornos adictivos. 1ªed. Madrid: Panamericana; 2006.
- Shorter D, Kosten TR. Novel pharmacotherapeutic treatments for cocaine addiction. *BMC Med.* 2011;9:119.
- Singh RK y Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):472-82
- Slaker M, Blacktop JM, Sorg BA. Caught in the Net: Perineuronal Nets and Addiction. *Neural Plast.* 2016; 2016:7538208
- Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet.* 2006;15(16):2490–508
- Solano Remírez M, Velilla Alcubilla JP, Álvarez Frías MT. Intoxicación aguda por cocaína. A propósito de un caso. *An Med Interna.* 2006;23(1):31-3.
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22: 1928-9.
- Soutullo Esperón C, Díez Suárez A. Manual de diagnóstico y tratamiento del TDAH. Madrid: Panamericana; 2007.
- Sterk CE, Dolan K, Hatch S. Epidemiological Indicators and Ethnographic Realities of Female Cocaine Use. *Subst Use Misuse.* 1999;34(14):2057-72.
- Strang J, Johns A, Caan W. Cocaine in the UK-1991. *Br J Psychiatry.* 1993;162:1-13.
- Suchanecka A, Grzywacz A, Samochowiec J. ANKK1 gene in psychiatry. *Psychiatr Pol.* 2011;45(3):349-56.
- Tarazi F, Zhang K, Baldessarini R. Dopamine D4 Receptors: Beyond Schizophrenia. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004;24(3):131–47.

- Thanos PK, Michaelides M, Umegaki H, Volkow ND. D2R DNA transfer into the nucleus accumbens attenuates cocaine self-administration in rats. *Synapse*. 2008;62(7):481–86.
 - Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, Morris CM, Perry RH, Ferrier IN, Court JA. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics*. 1997;7(6):479-84
 - Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. *Manual de Diagnostico Clínico y Tratamiento*. 35ª ed. México: El Manual Moderno; 2000.
 - Torres MA. *Historia de las adicciones en la España contemporánea*. Madrid: Socidrogalcohol; 2009.
 - Torres MA, Climent B. Complicaciones neurológicas por cocaína. *Adicciones*. 2006; 18(1), 179-96.
 - Uhl GR. Molecular genetic underpinnings of human substance abuse vulnerability: likely contributions to understanding addiction as a mnemonic process. *Neuropharmacology*. 2004;47:140-7.
 - Unterwald EM, Kreek MJ, Cuntapay M. The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain Res*. 2001;900(1):103-9.
 - Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 2000;408(6809):199-203
 - Van Der Veen R, Piazza PV, Deroche-Gamonet V. Gene-environment interactions in vulnerability to cocaine intravenous self-administration: a brief social experience affects intake in DBA/2J but not in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology*. 2007;193(2):179–86
 - Varady Hobrath J, Shaomeng W. Computational Elucidation Of The Structural Basis Of Ligand Binding To The Dopamine 3 Receptor Through Docking And Homology Modeling. *J. Med. Chem*. 2006;49(15):4470-6.
 - Vawter MP. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol*. 2000;405(1-3):385–95.
 - Verebey K, Gold MS. From coca leaves to crack: the effects of dose and routes of administration in abuse liability. *Psychiatr Annals*. 1988;18(9):513–20.
 - Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*. 1993;14(2):169-77.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Wong C, Hitzemann R, Pappas NR. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(1):409-15.

REFERENCIAS

- Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M. Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry*. 2001;158(12):2015-21.
- Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, van Daal A, Noble EP, Lawford BR, Young RM, Morris CP. A DRD2 and ANKK1 haplotype is associated with nicotine dependence. *Psychiatry Res*. 2012;196(2-3):285-9
- Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS, Logan J, Abumrad NN, Hitzemann RJ. Dopamine D2 receptor availability in opiate-dependent subjects before and after naloxone-precipitated withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 1997;16(2):174-82.
- Weber JE, Shofer FS, Larkin GL, Kalaria AS, Hollander JE. Validation of a brief observation period for patients with cocaine-associated chest pain. *N Engl J Med*. 2003;348(6):510-7.
- Weddington WW, Brown BS, Haertzen CA, Cone EJ, Dax EM, Herning RI, Michaelson BS. Changes in mood, craving and sleep during short-term abstinence reported by cocaine addicts. *Arch Gen Psychiatry*. 1990;47(9):861-8.
- White SM y Lambe CJ. The pathophysiology of cocaine abuse. *J Clin Forensic Med*. 2003;10:27-39.
- Wong CC, Mill J, Fernandes C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction*. 2011;106(3):480-9
- Wu JC, Bell K, Najafi A, Widmark C, Keator D, Tang C, et al. Decreasing striatal 6-FDOPA uptake with increasing duration of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17: 402-9.
- Yang BZ, 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;16(23):2844-53
- Yang BZ, 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;32(12):2117-27.
- Yang JH, Choe ES. Repeated cocaine administration increases cleaved poly(ADP-ribose) polymerase-1 expression in the rat dorsal striatum. *Neurosci Lett*. 2010;471(1):58-61.
- Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R, Lee ML, Xiao T, Papp A, Wang D, Sadée W. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20552-7.
- Zimmerman JL. Cocaine intoxication. *Crit Care Clin*. 2012;28(4):517-26.

8. ANEXOS

ANEXO I. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO



**Informe Dictamen Favorable
Proyecto Investigación Biomédica**

C.P. - C.I. PI13/0059

25 de marzo de 2015

Dña. María González Hinjos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 25/03/2015, Acta Nº 06/2015 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: Marcadores genéticos asociados a la dependencia de cocaína.

Investigador Principal: María Santamaría González. HCU Lozano Blesa

Versión protocolo: marzo 2013

Versión hoja de información a los pacientes: 20/marzo/ 2014

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el tratamiento de los datos.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del proyecto.**

Lo que firmo en Zaragoza, a 25 de marzo de 2015

Fdo:



★ Dña. María González Hinjos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

ANEXO II. ENCUESTA PARA EL PACIENTE

Edad

Sexo: Varón/Mujer

Fecha:

| ESTADO CIVIL | | | |
|--------------|--------------------|------------|-------|
| SOLTERO | CASADO O EN PAREJA | DIVORCIADO | VIUDO |
| | | | |

| ETNIA | | | | |
|-----------|-----------------|--------------|---------|--------|
| CAUCÁSICO | LATINOAMERICANO | SUBSAHARIANO | MAGREBÍ | GITANO |
| | | | | |

| ENTORNO | |
|---------|--------|
| RURAL | URBANO |
| | |

| NIVEL DE ESTUDIOS | | | | | |
|--------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--|
| NO SABE LEER NI ESCRIBIR | SIN ESTUDIOS (SABE LEER Y ESCRIBIR) | ESTUDIOS PRIMARIOS (EGB) | ESTUDIOS SECUNDARIOS (BUP,COU) | FORMACIÓN PROFESIONAL | ESTUDIOS UNIVERSITARIOS (DIPLOMATURA, LICENCIATURA) |
| | | | | | |

| SITUACIÓN LABORAL | | | | |
|-------------------|-----------|--------------|-------------|----------|
| DESEMPLEADO | EN ACTIVO | BAJA LABORAL | INCAPACIDAD | JUBILADO |
| | | | | |

| SUSTANCIA ADICTIVA PRINCIPAL | | | | |
|---|------------------------------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| ABUSO/DEPENDENCIA | CANTIDAD DIARIA CONSUMIDA (g./día) | INICIO DEL CONSUMO (años) | | |
| | | | | |
| SUSTANCIA ADICTIVA SECUNDARIA 1 | | | | |
| ABUSO/DEPENDENCIA | CANTIDAD DIARIA CONSUMIDA (g./día) | INICIO DEL CONSUMO (años) | | |
| | | | | |
| SUSTANCIA ADICTIVA SECUNDARIA 2 | | | | |
| ABUSO/DEPENDENCIA | CANTIDAD DIARIA CONSUMIDA (g./día) | INICIO DEL CONSUMO (años) | | |
| | | | | |
| SUSTANCIA ADICTIVA SECUNDARIA 3 | | | | |
| ABUSO/DEPENDENCIA | CANTIDAD DIARIA CONSUMIDA (g./día) | INICIO DEL CONSUMO (años) | | |
| | | | | |
| NO CONSUNE COCAÍNA DESDE: | | | | |
| (Solo en caso de que haya sido consumidor y actualmente se encuentre en periodo de abstinencia) | | | | |
| ANTECEDENTES FAMILIARES: especificar grado de parentesco y tipo de dependencia | | | | |
| | | | | |
| TRATAMIENTOS RECIBIDOS: | | | | |
| NOMBRE MEDICAMENTO | CANTIDAD DIARIA RECIBIDA | INICIO DEL TRATAMIENTO | FIN TRATAMIENTO | MEJORA (SI/NO) |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| OBSERVACIONES Y COMENTARIOS | | TELÉFONO CONTACTO: | | |

ANEXO III. INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Título del PROYECTO: Marcadores genéticos asociados a la dependencia de cocaína

La drogodependencia deriva de una interacción compleja entre factores ambientales y genéticos. Existen diversos estudios de investigación en los que se demuestra una asociación directa entre la dependencia a sustancias y diferentes variaciones genéticas. En el este estudio de investigación que planteamos, se pretende examinar y revisar la importancia que adquiere la herencia genética en este contexto, concretamente mediante el análisis de variaciones en el gen que codifica para el receptor D2 de dopamina (ANKK1) y genes continuos (DRD2, TTC12, NCAM1)

Para ello será necesario, la extracción de una única muestra de sangre. Este procedimiento no produce más molestias ni más riesgos que los de cualquier análisis de sangre.

Las muestras y los resultados obtenidos del análisis serán procesados de forma totalmente anónima y confidencial, conforme lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica guardando estricta confidencialidad.

En ningún caso, el material genético será utilizado con otros fines a los que aquí se indican sin su consentimiento, y en todo momento se garantizará el anonimato.

La investigación será llevada a cabo por:
miembro del grupo de investigación consolidado B42, reconocido por
el Gobierno de Aragón

Firma del Investigador:

Fecha:

ANEXO IV. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del PROYECTO: Marcadores genéticos asociados a la dependencia de cocaína

Yo, (nombre y apellidos del participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con:(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y para que se realice el análisis genético del que ya he sido previamente informado.

Acepto que las muestras derivadas de este estudio puedan ser utilizadas en futuras investigaciones (relacionadas con ésta), incluyendo análisis genéticos: sí no (marque lo que proceda)

He recibido una copia firmada de este Consentimiento Informado.

Firma del participante:

Fecha:

.....
.....

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado

Firma del Investigador:

Fecha:

.....

Consentimiento informado estudio 1 Versión 2, fecha 20 marzo 2014

ANEXO V. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA TRASTORNOS POR USO DE COCAÍNA. (DSM- IV)

1. DEPENDENCIA DE COCAÍNA: Patrón desadaptativo de consumo de la cocaína que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativo, expresado por tres (o más) de los siguientes elementos en algún momento en un periodo continuado de 12 meses

- **Tolerancia.** Definida por cualquiera de los elementos siguientes:
 - A. Necesidad de cantidades crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado
 - B. El efecto de la misma cantidad de la cocaína disminuye claramente con su uso continuado

- **Abstinencia.** Definida por cualquiera de los elementos siguientes:
 - A. Síndrome de abstinencia característico de la cocaína
 - B. Se toma cocaína (o una sustancia parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

- La cocaína se toma con frecuencia en **cantidades mayores y durante periodos de tiempo más largos** de lo que se pretendía inicialmente.

- Deseo persistente o **esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo** de cocaína

- Se emplea **mucho tiempo** en actividades relacionadas con la obtención o el consumo de cocaína, o la recuperación de sus efectos.

- **Reducción o abandono de actividades** sociales, laborales o de ocio a causa del consumo de la cocaína

- Se continua consumiendo a pesar de tener **conciencia de los problemas físicos o psicológicos** persistentes o recurrentes causados o exacerbados por el consumo de cocaína

2. ABUSO DE COCAÍNA

- A. Patrón desadaptativo de consumo de cocaína que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativo, expresado por uno o más de los siguientes elementos en un periodo de 12 meses:
1. Consumo recurrente de cocaína, que da lugar a incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o la casa.
 2. Consumo recurrente de cocaína en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso
 3. Problemas legales repetidos relacionados con la cocaína
 4. Consumo continuado de cocaína a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o continuos causados o exacerbados por los efectos de la cocaína
- B. Los síntomas no han cumplido nunca los criterios para la Dependencia de la cocaína

3. INTOXICACIÓN POR COCAÍNA

- A. **Consumo** reciente de cocaína
- B. **Cambios psicológicos o conductuales** desadaptativos clínicamente significativos (p.ej., euforia o afectividad embotada; aumento de la sociabilidad; hipervigilancia; sensibilidad interpersonal; ansiedad; tensión o cólera; comportamientos estereotipados; deterioro de la capacidad de juicio, o deterioro de la actividad laboral o social) que se presentan durante, o poco tiempo después, del consumo de cocaína
- C. **Dos o más** de los siguientes signos, que aparecen durante o poco tiempo después del consumo de cocaína:
1. Taquicardia o bradicardia
 2. Dilatación pupilar
 3. Elevación o disminución de la tensión arterial
 4. Sudoración o escalofríos
 5. Náuseas o vómitos
 6. Evidencia de pérdida de peso
 7. Agitación o disminución psicomotorora
 8. Debilidad muscular, depresión respiratoria, dolor torácico o arritmias cardíacas
 9. Confusión, crisis comiciales, discinesias, distonías o coma
- D. Los síntomas no se explican por la presencia de otro trastorno mental

4. ABSTINENCIA DE COCAÍNA

- A. Interrupción (o disminución) del consumo prolongado de abundantes cantidades de cocaína
- B. Estado de ánimo disfórico y dos (o más) de los siguientes cambios fisiológicos que aparecen pocas horas o días después del criterio A:
 - 1. Fatiga
 - 2. Sueños vividos y desagradables
 - 3. Insomnio o hipersomnia
 - 4. Aumento del apetito
 - 5. Retraso o agitación psicomotores
- C. Los síntomas del criterio B causan un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad laboral, social o de otras áreas importantes de la actividad del sujeto
- D. Los síntomas no son debidos a enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental

