

**ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA
ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO REP-1 DEL GEN SNCA
CON ALCOHOL-DEPENDENCIA EN UNA
MUESTRA DE POBLACIÓN UNIVERSITARIA COLOMBIANA**

***EXPLORATORY STUDY OF THE
ASSOCIATION OF THE REP-1 GENE POLYMORPHISM OF THE SNCA
GENE WITH ALCOHOL-DEPENDENCE IN A
COLOMBIAN UNIVERSITY POPULATION SAMPLE***



Figura 1. Técnicas de biología molecular, estadística y procedimientos que permiten identificar polimorfismos en gen diana y asociarlo con una patología.

**Estudio exploratorio de la asociación del polimorfismo genético rep-1
del gen SNCA con alcohol-dependencia en una muestra de población
universitaria colombiana**

***Exploratory study of the association of the SNCA gene rep-1 genetic
polymorphism with alcohol-dependence in a sample of the Colombian
university population***

Jhann Pierre Alexander Ocampo Torres, Mauricio Rey Buitrago

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Mauricio Rey Buitrago

Resumen

En este trabajo se realizaron una serie de ensayos moleculares con el fin de determinar la presencia de un polimorfismo de longitud para el gen de la alfa sinucleína (SNCA-Rep1), el cual en algunos estudios se ha visto relacionado con predisposición a problemas de alto consumo y/o adicción al alcohol. Para lograr lo anteriormente propuesto se emplearon diversas técnicas de biología molecular junto con herramientas bioestadísticas con el fin de comparar los datos obtenidos sobre la presencia del polimorfismo particular en el gen (SNCA) de los individuos control con aquellos que presentan problemas con el consumo de alcohol.

Palabras clave: Asociación– Alcoholismo – Alfa sinucleína – Alelos – Polimorfismos – Adicción.

Abstract

In this work, a series of molecular tests were carried out in order to determine the presence of a particular polymorphism for the alpha synuclein gene (SNCA-Rep1), which have been related to predisposition to problems of high consumption and / or alcohol addiction. To achieve the aforementioned, various molecular biology techniques were used together with biostatistical tools in order to compare the data obtained on the presence of the particular polymorphism in the gene (SNCA) of the control individuals with those who present problems with alcohol consumption.

Keywords: Association – Alcoholism - Alpha synuclein - Alleles - Polymorphisms - Addiction.

Introducción

Según el reporte a nivel mundial de consumo de alcohol para el año 2018 publicado por la OMS, en América se consume más alcohol que en el resto de continentes, con una tasa de 13.0%, siendo la causa de una de cada 20 muertes. Adicionalmente, el alcohol es uno de los principales factores de riesgo de muerte y discapacidad en personas en un rango de edades entre 15-49 años, causando pérdida salarial en millones de dólares anualmente. En Colombia, se reporta una tasa de defunciones para mujeres de 5.2 por cada 100000 habitantes y para hombres de 29.7 por cada 100000 habitantes [1].

La alcohol dependencia es una patología de carácter multifactorial que afectan diversos sistemas y órganos particularmente el sistema de recompensa del cerebro tiene diversos factores que las desencadenan, entre ellas se encuentra que es causada por errores en mecanismos principalmente de replicación, reparación y mantenimiento del ADN, que también pueden conllevar la aparición de polimorfismos los cuales son variantes en las bases nitrogenadas del DNA que presenta frecuencia mayor al 1% de uno de sus alelos [2].

Existen diversos tipos de polimorfismos, entre los cuales se encuentran con mayor frecuencia los de nucleótido sencillo (SNV – *Single nucleotide Variant*, SNP - *Single nucleotide Polimorphism*), la mayoría de estos contienen dos alelos que se representan por la sustitución de una base por otra. Los SNV's antiguamente llamados SNP's presentan efectos funcionales como lo es afectar los niveles de expresión, se conocen como SNV reguladores (rSNV) que se encuentran en las regiones promotoras afectando su expresión. Los srSNP están en ARNm primarios y secundarios, incluyendo las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), regiones intrónicas y las codificantes, afectando

la estructura y la función, incluyendo corte y empalme dando origen a isoformas de la proteína, regulación de traducción, funcionalidad y otros procesos normales [3].

El alcoholismo hace referencia a sujetos que son psicológicamente dependientes al alcohol [4], junto con esto hay que aclarar términos relacionados con el alcoholismo ya que como enfermedad estipulada presenta cierto tipo de características.

- **Dependencia del alcohol:** Es un patrón de beber cantidades excesivas de alcohol de forma habitual durante un período prolongado, haciendo este en Colombia un total de 50g [5] de alcohol diarios lo cual equivaldría a 3 bebidas, esta dependencia presenta síntomas de abstinencia entre las 8 y 12 horas después de disminuir la ingesta de cantidades elevadas de alcohol.
- **Abstinencia de alcohol:** Los síntomas aparecen cuando se detiene la ingesta de alcohol luego de un período de ingesta en exceso. Algunos de los síntomas son dolores de cabeza, náuseas, temblores, ansiedad, alucinaciones y convulsiones, los cuales son aliviados con frecuencia tras administrar alcohol. [6]
- **Abuso del alcohol:** En muchos casos, la abstinencia de alcohol requiere tratamiento médico y hospitalización, ya que algunas personas las llegan a ignorar en casos de riesgo y continúan su consumo tales como: conducir, operar máquinas etc. [6]
- **Intoxicación por alcohol:** Se trata de cambios comportamentales no adaptativos (agresividad, labilidad emocional, deterioro de la capacidad de juicio y la actividad laboral), que se manifiestan durante o posterior a la ingesta de alcohol. Generalmente se acompaña de farfuleo, problemas de coordinación, movimiento inestable, nistagmo, pérdida de la atención y memoria, y en algunos casos estupor

o coma [7].

El rep-1 de alfa-sinucleína es un microsatélite polimórfico tipo dinucleótido que se encuentra 10 Kb corriente arriba del gen y es esencialmente trialélico (259, 261 y 263 pares de bases de longitud), en algunos trabajos ha sido asociado al fenotipo de abuso, búsqueda y dependencia al alcohol relacionándolo con cambios en los niveles de expresión de este gen. Se han visto en diversos estudios que los polimorfismos presentes en el gen de alfa-sinucleína (SNCA-Rep1) son una constante en personas que tienen problemas con el consumo de algún tipo de sustancia particularmente con el alcohol ya que variantes de la α -sinucleína se ha implicado recientemente en la fisiopatología del abuso de alcohol debido a su papel en la neurotransmisión dopaminérgica. Estudios realizados en tejido de cerebro humano evidenció que la expresión de alfa-sinucleína variaba entre pacientes diagnosticados con alcoholismo y controles, lo que puede contribuir tanto a la susceptibilidad como al abuso crónico de alcohol a la vez que con el fenotipo de la dependencia al alcohol y el deseo [8] [9][10].

Algunos trabajos han mostrado una mayor frecuencia en el polimorfismo Rep-1 del alelo de 267 pb que se asocia con una disminución en la expresión de esta proteína por lo cual las personas con al menos una copia del alelo de 267 pb tenían más probabilidades de exhibir un fenotipo relacionado con abuso y/o adicción al alcohol [10][11]. El alelo más corto del marcador α -sinucleína Rep-1 se asoció con una disminución de la expresión de α -sinucleína en la corteza prefrontal [12]. Las personas con al menos una copia del alelo de 267 pb tenían más probabilidades de exhibir un fenotipo de abuso de alcohol. Estos resultados sugieren que los individuos con el alelo de 267 pb pueden tener un mayor riesgo de desarrollar alcoholismo y que la variación genética en el locus de repetición 1 de

α -sinucleína puede influir en la expresión de α -sinucleína en la corteza prefrontal y quizás se vea reflejado en sangre [13], lo cual se podría observar a través de la realización de una qPCR para obtener un marcador molecular para esta patología que por ahora no lo tiene [14]. Actualmente, con la implementación de estudios de genómica total, transcriptómica, epigenómica, de respuesta a fármacos con herramientas como microarreglos y de secuenciación de ADN de siguiente generación, los blancos genéticos se han ampliado, diversificado y han permitido analizar la expresión de genes [15].

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables en el patrón de expresión génica que no involucran una alteración en la secuencia del ADN, teniendo en cuenta la utilización selectiva, activación o inactivación, de la información genética. Estas modificaciones son dinámicas durante la vida y pueden llegar a ser altamente influenciadas por factores externos. Teniendo en cuenta esto, se ha demostrado que el entorno puede modular la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos que incluyen remodelación de la cromatina, modificación de las histonas, regulación de ARN no codificante, microARN, y metilación del ADN, que cumple un papel esencial en la regulación génica de mamíferos [16].

La importancia de estudiar la presencia de este polimorfismo (Rep-1) radica en que también puede ser una causa de susceptibilidad, adicción y abuso del alcohol ya que estudios realizados en gemelos han reportado un índice de heredabilidad de estos genes de entre un 40% y 60% de personas que tienen antecedentes de consumo elevado de alcohol o padecen algún tipo de afección ya sea elevado consumo, adicción o dependencia.

Por lo tanto, el estudio de polimorfismos es importante ya que es útil en diferentes campos como lo son la salud [17], procesos jurídicos y en la investigación ya que se pueden utilizar como marcadores de ciertas enfermedades, por ejemplo, si el presentar ciertos polimorfismos puede ser causal de riesgo para el desarrollo o progresión de alguna enfermedad. Los polimorfismos localizados cerca de un “gen candidato” pueden ser usados para hallar el gen por sí mismo a través de un mapeo genético. En este proceso el investigador está en búsqueda de polimorfismos que son heredados junto con la enfermedad, tratando de delimitar estos polimorfismos en regiones más y más pequeñas del cromosoma. Así, la región del cromosoma implicada en la enfermedad puede ser progresivamente delimitada, y el gen o los genes responsables finalmente pueden ser localizados. [18][19].

Por las razones expuestas, la finalidad del presente trabajo fue determinar, las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Rep-1 de alfa sinucleína en una muestra de población universitaria, además de analizar la asociación de este polimorfismo con la predisposición o susceptibilidad a la alta ingesta de alcohol en una muestra de población universitaria colombiana.

Materiales y Métodos

De la población general, se tomó aproximadamente una muestra de 50 voluntarios, 25 controles y 25 alcohol dependientes. Se incluyeron individuos en apariencia sanos, de ambos sexos, tanto estudiantes como empleados de la Universidad Nacional de Colombia, con residencia en la ciudad de Bogotá, con edades comprendidas entre 18 y 62 años. No se estratifico por procedencia, grupo étnico, o nivel socioeconómico. Previa

firma del consentimiento informado, se aplicó un cuestionario con datos de historia clínica para obtener información sobre antecedentes familiares de enfermedades vasculares, estilo de vida, (hábito de fumar, ejercicio, dieta etc.) además de aplicar la herramienta AUDIT para determinar el grupo de pertenencia de los participantes (controles y personas con problemas con el consumo de alcohol).

Para realizar la extracción de ADN se usó la técnica de Salting out [20]. Se homogeneizó el tubo con la muestra por inversión varias veces. Se agregó en un tubo eppendorf 900 μ L de buffer de lisis de glóbulos rojos. Luego se adiciono 400 μ L de la muestra sanguínea. Posteriormente se centrifugó a 14.000rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante en dejando aproximadamente 20 μ L con el pellet. se llevaron a cabo tres lavados con 900 μ L de buffer de lisis de glóbulos rojos. Después del último lavado, se resuspendió muy bien el pellet con ayuda del vórtex por 30 segundos. Se adicionó 500 μ L de buffer de lisis de glóbulos blancos y mezcló por inversión. Luego se adicione 500 μ L de NaCl 5M y mezcló por vórtex por 30 segundos e incubo 5 minutos en hielo. Se llevó a cabo una Centrifugación a 14.000 rpm por 10 minutos (precipitación de proteínas). Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5ml que contenía 500 μ L de isopropanol. Se mezcló bien por inversión varias veces y observó la aparición de una mota blanca la cual era ADN. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. El ADN se observó como un pellet blanco. Se descartó el sobrenadante y lavó el pellet con 1ml de etanol al 70%. Se mezcló por inversión varias veces y luego se centrifugó a 14.000 rpm por dos minutos. Se descartó el etanol cuidadosamente, evitando desprender el pellet. Se secaron los restos de etanol en Speed Vac por 15 minutos a temperatura alta (aproximadamente 55° C). El pellet se resuspendió con 100 μ L de buffer TE 1X e incubó a 55°C por 1 hora. El ADN extraído se dejó disolver incubando a 37°C durante la noche y

las muestras se almacenaron a 4°C después de la cuantificación y las pruebas [20]. La amplificación del ADN se llevó a cabo a través de PCR convencional para la cual con ayuda de las herramientas todas ellas gratuitas “Primer-Blast” “Primer 3” y “Masajista de secuencias” se diseñaron los correspondientes primers o cebadores, siendo estos 5'-CCTGGCATATTTGATTGCAA-3' el primer *forward* y 5'-GACTGGCCCAAGATTAACCA-3' el primer *reverse*. Las condiciones que se requerían para llevar a cabo este proceso fueron : 2 µL del DNA, buffer de reacción 10x 2,5µL, primer forward y reverse 10 mM 0,5 µL, taq polimerasa 0,125 µL y 18,375 µL de agua para un volumen final de 25 µL, esto a 95°C durante 5 minutos, 95°C durante 30 segundos, 49.9°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y 7 minutos para concluir con 7°C al infinito esto durante 35 ciclos y se tomaron 1,5 µL de DNA (estas condiciones fueron las óptimas luego de ensayos preliminares con gradientes de temperatura) (imagen 1), [22]. Se llevó a cabo una electroforesis tanto en gel de poliacrilamida al 9% como electroforesis capilar la cual permitió una mejor visualización de este polimorfismo (Rep-1) y los diferentes alelos que este presentó. Para esto se utilizó el equipo ABI PRISM 310 con previo calentamiento a 60°C y la utilización del polímero de acrilamida (POP-4) junto con el buffer Genetic analyzer compuesto de 13.5 ml de agua y 1.5 ml del buffer predeterminado.

Se determinará la secuencia de nucleótidos de algunos de los productos de amplificación utilizando el ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems) [23]. Para identificar los diferentes alelos además de si los pacientes eran homocigotos o heterocigotos se utilizó el software Gene Marker Versión 2.6.

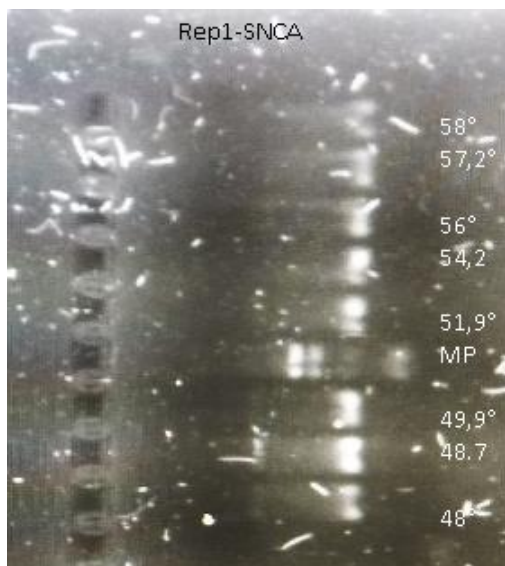


Imagen 1. Selección de temperatura óptima para PCR (temperatura de fusión)

Resultados y Discusión

En este ensayo piloto participaron 50 individuos, 25 como controles y 25 como casos, es decir sujetos con problemas de consumo de alcohol. Para poder clasificarlos se utilizó la herramienta AUDIT (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Información Preliminar de Pacientes.

	<u>Genero</u>	<u>Edad</u>	<u>AUDIT</u>
1 A	Masculino	22	21
2 A	Masculino	26	19
3 A	Masculino	22	18

4 A	Femenino	19	17
5 A	Masculino	21	18
6 A	Masculino	22	16
7 A	Masculino	22	24
8 A	Masculino	22	27
9 A	Masculino	24	18
10 A	Masculino	23	16
11 A	Masculino	22	17
12 A	Masculino	24	19
13 A	Masculino	21	16
14 A	Masculino	18	16
15 A	Femenino	26	17
16 A	Masculino	23	27
17 A	Masculino	27	19
18 A	Femenino	28	17
19 A	Masculino	22	18
20 A	Femenino	19	16
21 A	Masculino	33	19
22 A	Masculino	20	16
23 A	Femenino	35	18
24 A	Masculino	22	23
25 A	Femenino	23	16

Tabla 2. Información Preliminar de Controles.

	<u>Genero</u>	<u>Edad</u>	<u>AUDIT</u>
1 C	Femenino	22	1
2 C	Femenino	23	2
3 C	Masculino	25	0
4 C	Femenino	19	0
5 C	Femenino	27	1
6 C	Femenino	20	2
7 C	Femenino	22	1
8 C	Femenino	26	2
9 C	Femenino	21	1
10 C	Femenino	23	2
11 C	Femenino	26	2
12 C	Femenino	18	1
13 C	Masculino	22	1
14 C	Masculino	30	0
15 C	Masculino	24	1
16 C	Femenino	20	0
17 C	Femenino	21	1
18 C	Masculino	27	0
19 C	Masculino	23	2
20 C	Masculino	29	1
21 C	Femenino	25	2
22 C	Femenino	24	0
23 C	Masculino	21	1

24 C	Masculino	20	1
25 C	Femenino	29	2

Durante el proceso de identificación de los diferentes alelos (261, 265, 267, 269, 271, 273, 275) a través de geles de poliacrilamida se encontraron ciertos patrones que generaron grandes dudas en la asignación alélica para lo cual se llevó a cabo una electroforesis capilar con el fin de vislumbrar de una forma más clara que alelo era el que estaba presentando cada muestra. Durante el proceso de interpretación de los electroferogramas para determinar si un paciente era homocigoto o heterocigoto se presentaban especies de artefactos denominados stutters los cuales se presentan unos picos de interferencia que dados ciertos parámetros como altura y distancia con respecto a los picos principales podrían ser descartados sin afectar la interpretación del electroferograma [24], y así poder determinar las frecuencias alélicas más fácilmente (Fig 1 y 2).

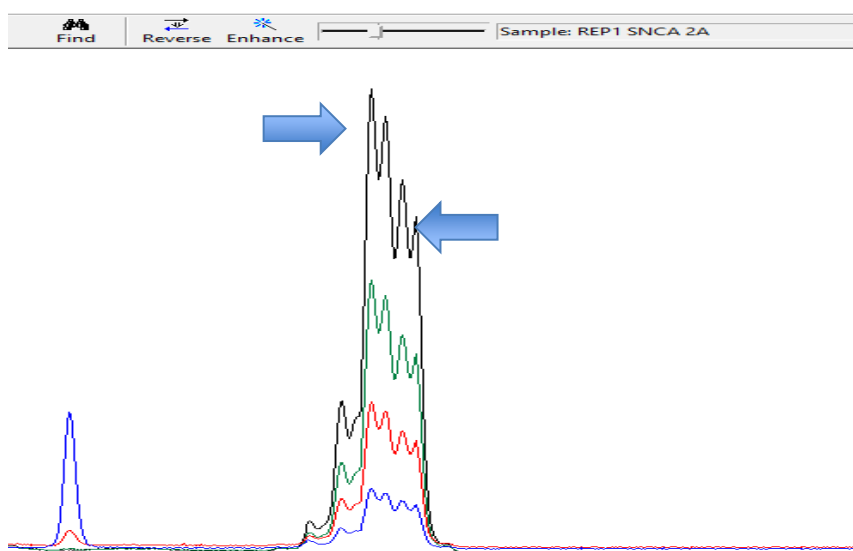


Figura1. Electroferograma de paciente (2A) heterocigoto.

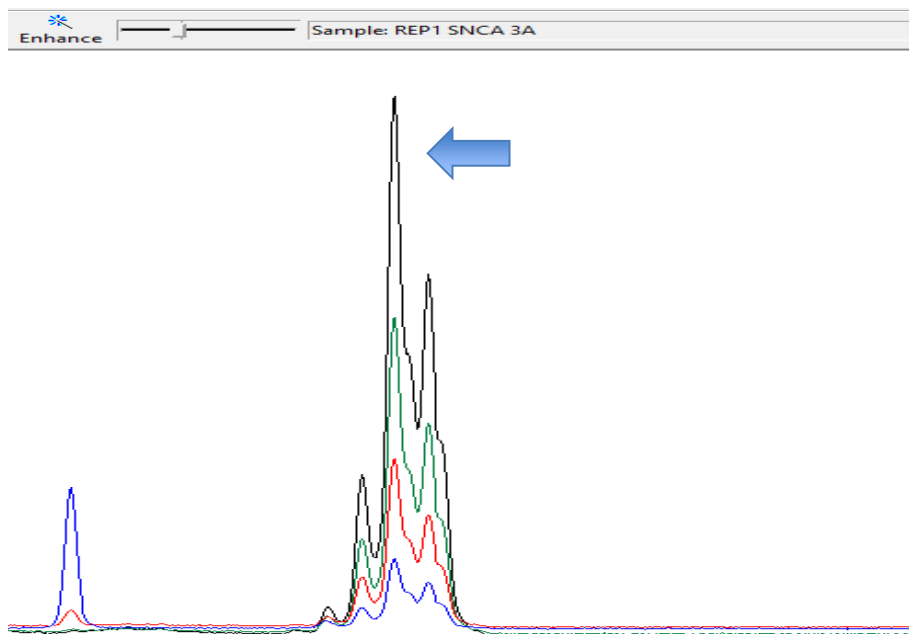


Figura 2. Electroferograma de paciente (3A) Homocigoto.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo Rep-1 de alfa-sinucleína mostraron que aparte de los alelos de 267, 269, 271 pb es posible encontrar más alelos de diferentes tamaños tanto en los controles como en aquellos que presentan alto consumo de alcohol (Tabla 6). Los genotipos, en específico los 271/271 y el 269/271 (Tabla 3) están presentes en una gran cantidad de pacientes pero que además la presencia de los demás alelos nos mostraron un posible incumplimiento de la ley de “Hardy-Weinberg” lo que indicaría un desequilibrio o que la población es muy pequeña y se requieren de más participantes para el estudio.

Tabla 3. Genotipos encontrados, tamaño de muestra por poblaciones.

<u>Genotipos</u>	<u>Controles</u>	<u>Pacientes</u>	<u>Porcentaje</u>
263/263	1	0	2%
267/267	0	1	2%
265/269	0	1	2%

267/269	1	6	14%
269/269	4	2	12%
269/271	10	8	36%
271/271	7	7	28%
271/273	1	0	2%
269/273	1	0	2%
	25	25	100%

Si tenemos en cuenta “La ley de Hardy-Weinberg” la cual establece que, en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra [25], lo que en este caso se observó que no cumplen con esta ley (Fig. 3 y 4) (Tabla 5 ,6 y 7). Además, la obtención de los valores *Odds ratio* para cada uno de los alelos y para los genotipos no mostró que efectivamente los que tienen un valor mayor a uno son los marcadores que presentan una mayor probabilidad de ser susceptibles a un elevado consumo de alcohol esto lo podemos corroborar mirando los resultados el alelo 267,269 y 271 los cuales tanto su valor individual como su valor en presencia de genotipo confirman lo dicho anteriormente.

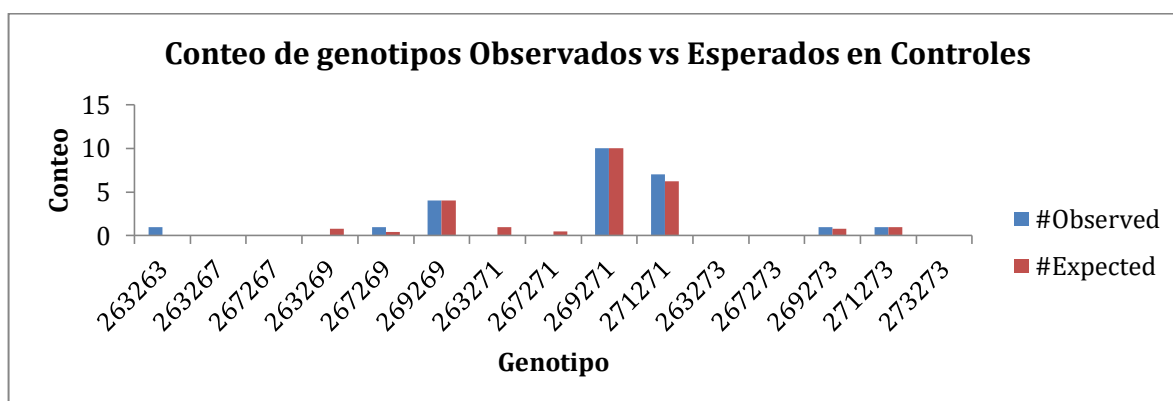


Figura 3. Genotipos encontrados vs esperados en controles.

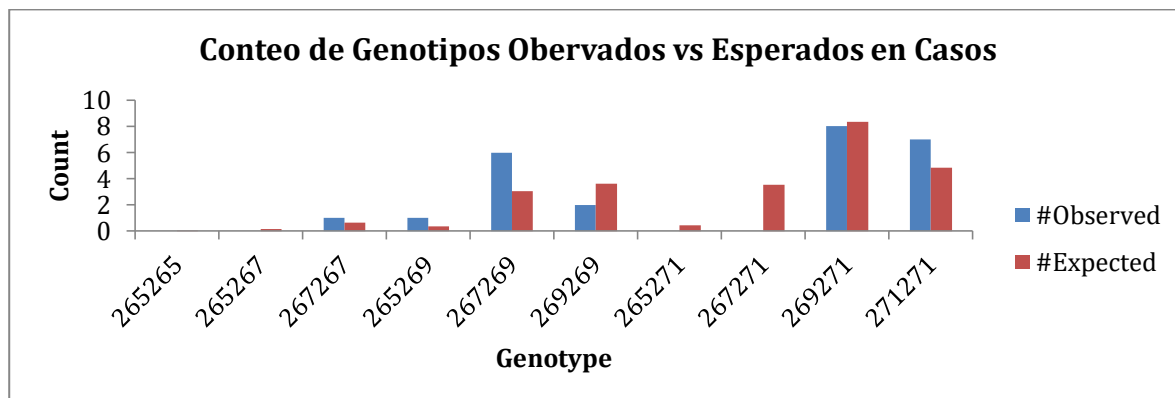


Figura 4. Genotipos encontrados vs esperados en alcohólicos

Tabla 4. Análisis de frecuencias entre los genotipos en controles.

<u>Genotipos</u>	<u>Observados</u>	<u>Esperados</u>
263/263	1	0,040
267/269	1	0,040
269/269	4	4,000
269/271	10	10,000
271/271	7	6,250
269/273	1	0,800
271/273	1	1,000
273/273	1	0,040

Tabla 5. Análisis de frecuencias entre los genotipos en alcohólicos.

<u>Genotipos</u>	<u>Observados</u>	<u>Esperados</u>
267/267	1	0,640
265/269	1	0,380
267/269	6	3,040
269/269	2	3,610
269/271	8	8,360
271/271	7	4,840
269/273	1	1,207
271/273	2	1,598
273/273	1	0,049

Tabla 6. Frecuencias alélicas y Odds Ratio en ambas poblaciones.

<u>Alelos</u>	<u>Controles (25)</u>	<u>Pacientes (25)</u>	<u>Odds Ratio</u>	<u>IC (95%)</u>	<u>Valor P</u>
263	0,040	0,000	0.320	0,012 – 8,246	0,492
265	0,000	0,020	0	0	0
267	0,020	0,160	9,333	0,01-0,95	0,044
269	0,400	0,380	1,195	0,370-3,858	0,383
271	0,500	0,440	1,714	0,525-5,603	1,714
273	0,040	0,000	0	0	0

Tabla 7. Odds Ratio para los Genotipos.

<u>Genotipos</u>	<u>Odds Ratio</u>	<u>IC (95%)</u>	<u>Valor P</u>
263/263	37,059	0,133 - 103,1199	0,442
265/269	0,411	0,014 - 11,4578	0,601
267/267	0,411	0,014 - 11,4578	0,601
267/269	75	0,742 - 75,7239	0,087
269/269	0,625	0,090 - 4,329	0,634
269/273	37,059	0,133 - 103,119	0,440
271/271	12,5	0,308 - 5,072	0,754
271/273	37,059	0,133 - 103,119	0,440

Conclusiones

- Por primera vez se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rep-1 en el gen SNCA en una muestra de población colombiana.
- Aunque el tamaño de muestra es una gran limitante y su desequilibrio genético sugiere aumentar su tamaño; el análisis estadístico preliminar nos permite concluir que este polimorfismo no está relacionado con un alto consumo o abuso del alcohol en una muestra de una institución universitaria colombiana.

Agradecimientos

En primera instancia agradezco a mi mamá, mis abuelos, formadores, personas de gran sabiduría que han sabido guiarme para traerme a este lugar, a la Universidad Antonio Nariño por haberme permitido descubrir este programa que me llevó a convertir en profesional, a la Universidad Nacional de Colombia que permitió el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo específicamente al instituto de genética y al grupo de investigación. Finalmente, agradezco a mi director de trabajo de grado el profesor Mauricio Rey Buitrago el cual estuvo presente desde el primer día que decidí embarcarme en este viaje llamado Bioquímica.

Referencias

- [1] O. P. de la Salud, "Informe sobre la situación regional sobre el alcohol y la salud en las Américas," 2015.
- [2] R. Iniesta, E. Guinó, and V. Moreno, "Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies," *Gac. Sanit.*, vol. 19, no. 4, pp. 333–341, 2005.
- [3] J. Ramírez-Bello, G. Vargas-Alarcón, C. Tovilla-Zárate, J. M. Fragoso, and J. Badiano, "Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas Gaceta Médica de México. 2013;149:220-8 ARTículo de Revisión correspondencia," 2013.
- [4] J. C. M. Brust, "Ethanol and cognition: Indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: A review," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 7, no. 4. pp. 1540–1557, Apr-2010.
- [5] American Psychological Association (APA), *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*. 2002.
- [6] A. Díaz-Anzaldúa, A. Díaz-Martínez, L. Rosa Díaz-Martínez, and D. Leonila Rosa Díaz Martínez, "The complex interplay of genetics, epigenetics, and environment in the predisposition to alcohol dependence," 2011.
- [7] American Psychological Association (APA), *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*. 2002.
- [8] "Genomic screen for loci associated with alcohol dependence in Mission Indians. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15274051>. [Accessed: 18-Apr-2020].
- [9] P. Janeczek and J. M. Lewohl, "The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism," *Neurochemistry International*. 2013.
- [10] K. D. Cronin *et al.*, "Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human α -synuclein in transgenic mouse brain," *Hum. Mol. Genet.*, 2009.
- [11] M. D. Escarabajal, "Alteraciones genéticas relacionadas con el alcoholismo," *Revista de Neurología*. 2003.
- [12] P. Janeczek, R. K. Mackay, R. A. Lea, P. R. Dodd, and J. M. Lewohl, "Reduced Expression of α -Synuclein in Alcoholic Brain: Influence of SNCA-Rep1 Genotype."
- [13] L. Brighina *et al.*, " α -Synuclein, alcohol use disorders, and Parkinson disease: A case-control study," *Park. Relat. Disord.*, 2009.
- [14] M. S. Pajares Ortiz, J. Díaz Jiménez, J. C. Montero Rubio, J. C. Alberdi Odriozola, and I. J. Mirón Pérez, "Daily mortality in the autonomous community of Madrid during the period 1986-1991 in the 45-64 age group: its relationship with temperature," *Rev. Esp. Salud Pública*, vol. 71, no. 2, Mar. 1997.
- [15] M. A. Matzke and J. A. Birchler, "RNAi-MEDIATED PATHWAYS IN THE NUCLEUS," vol. 6, 2005.
- [16] A. M. Gaviria Gómez, "Análisis de la causalidad en el estudio genético de los trastornos neuropsiquiátricos: revisión narrativa," *Med. UPB*, vol. 36, no. 2, pp. 138–145, Jul. 2017.
- [17] M. Rey-Buitrago, "Molecular genetics of alcoholism," *Rev. Fac. Med.*, vol. 63, no. 3, pp. 483–494, Jul. 2015.
- [18] "Diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne mediante análisis del ácido desoxinucleotico y su aplicación en la prevención." [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75311996000100003. [Accessed: 18-Apr-2020].

- [19] M. Antonio Checa Caratachea, “REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS medigraphic.com COMUNICACIÓN DE INTERÉS REV INST NAL ENF RESP MEX VOLUMEN 20-NÚMERO 3 JULIO-SEPTIEMBRE 2007 Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones,” 2007.
- [20] N. M. Lopera-Barrero, J. A. Povh, R. P. Ribeiro, P. C. Gomes, C. B. Jacometo, and T. da Silva Lopes, “Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio,” *Cienc. e Investig. Agrar.*, 2008.
- [21] T. Doctoral, J. Manuel, and A. Martínez, *UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA FACULTAD DE FARMACIA DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGÍA Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de Bacillus licheniformis.* .
- [22] “(PDF) Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/233536780_Comparison_of_real-time_PCR_and_conventional_PCR_with_two_DNA_targets_for_detection_of. [Accessed: 18-Apr-2020].
- [23] J. J. Magaña, M. de la L. Arenas-Sordo, and R. Gómez, “La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico,” *Revista Medica de Chile*, vol. 137, no. 7. pp. 946–956, Jul-2009.
- [24] R. Puch-Solis *et al.*, “Evaluating forensic DNA profiles using peak heights, allowing for multiple donors, allelic dropout and stutters,” *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 7, no. 5, pp. 555–563, 2013.
- [25] N. -Colín, “OF EQUILIBRIUM WORK IN AUTOPOLYPLOIDS AS IT DOES IN DIPLOIDS?”