

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Martínez-Rodríguez TY, Rey-Buitrago M. Expresión de alfa sinucleína en sangre y su relación con el estreñimiento crónico en población residente en Bogotá, D.C. con problemas de consumo de alcohol. *Biomédica*. 2020;40 (2).

Recibido: 15-11-18

Aceptado: 12-09-19

Publicación en línea: 13-09-19

Expresión de alfa sinucleína en sangre y su relación con el estreñimiento crónico en población residente en Bogotá, D.C. con problemas de consumo de alcohol

Alpha sinuclein expression in blood and its relationship with chronic constipation in a population resident in Bogotá, D.C. with problems of alcohol consumption

Alfa sinucleína, estreñimiento y consumo de alcohol

Tania Yadira Martínez-Rodríguez ¹, Mauricio Rey-Buitrago ²

¹ Maestría en Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

² Maestría en Genética Humana, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

Correspondencia:

Mauricio Rey-Buitrago, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 45 No. 26-85, edificio 426, Bogotá, D.C., Colombia.

Tel: +57 1 3165000, ext: 11610

mrey@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Ambos autores participaron en todas las etapas de la investigación.

Introducción. El consumo excesivo de alcohol resulta en neuroadaptación, neurodegeneración y expresión diferencial de numerosos genes.

Objetivo. Determinar la relación entre la expresión del gen de la alfa sinucleína en sangre, polimorfismos de nucleótido simple (actualmente SNV's) en su región promotora y el estreñimiento crónico en personas con problemas de consumo de alcohol.

Materiales y métodos. La muestra estuvo conformada por 35 controles y 27 casos, seleccionados de acuerdo al puntaje obtenido con la herramienta AUDIT. Para el diagnóstico de estreñimiento se aplicaron los criterios Roma IV. Se realizó extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica y se evaluó la expresión del gen mediante qPCR, cuantificación proteica por ELISA y la presencia de SNV's en la región promotora del gen por secuenciación Sanger.

Resultados. Se observó sobreexpresión génica relativa de ARNm de SNCA en el grupo de casos, lo cual no se relacionó con estreñimiento crónico. Se evidenció un riesgo 4,8 veces mayor de presentar estreñimiento en el grupo de casos. Se encontraron 9 polimorfismos de nucleótido simple en un segmento de la región promotora del gen rica en secuencias reguladoras CpG, con frecuencia similar entre los grupos y se identificó un polimorfismo en la posición -2171, que no se encuentra reportado en GenBank para variantes clínicas y cuyo genotipo A/T se relacionó con incremento en la expresión de ARNm de SNCA.

Conclusión. En personas con problemas de consumo de alcohol, se evidenció sobreexpresión de ARNm de alfa sinucleína, lo cual no estuvo relacionado con el diagnóstico de estreñimiento crónico.

Palabras clave: alcoholismo; estreñimiento; alfa-sinucleína; expresión génica; polimorfismo genético; inflamación.

Introduction: Excessive alcohol consumption results in neuroadaptation, neurodegeneration and differential expression of numerous genes.

Objective: To determine the relationship between the expression of the alpha synuclein gene in blood, simple nucleotide polymorphisms (currently SNVs) in its promoter region and chronic constipation in people with problems of alcohol consumption.

Materials and methods: The sample consisted of 35 controls and 27 cases, selected according to the score obtained with the AUDIT tool. For the diagnosis of constipation, the Rome IV criteria were applied. Nucleic acid extraction was performed from peripheral blood and the expression of the gene was evaluated by qPCR, protein quantification by ELISA and the presence of SNV's in the promoter region of the gene by Sanger sequencing.

Results: Relative gene overexpression of SNCA mRNA was observed in the case group, which was not related to the diagnosis of chronic constipation. There was a 4.8 times greater risk of presenting constipation in the group of cases. In addition, 9 single nucleotide polymorphisms were found in a segment of the promoter region of the gene rich in CpG regulatory sequences, with similar frequency between the groups and a polymorphism was identified in position -2171, which is not reported in GenBank for variants and whose genotype A / T was associated with increased expression of SNCA mRNA.

Conclusion: In people with problems of alcohol consumption, overexpression of alpha synuclein mRNA was evidenced, which was not related to the diagnosis of chronic constipation.

Keywords: alcoholism; constipation; alpha synuclein; gene expression; genetic polymorphism; inflammation.

A nivel mundial, se estima que anualmente el abuso del alcohol causa más de dos millones de muertes y diferentes patologías agudas y crónicas, incrementando los costos en atención en salud y comprometiendo el desarrollo del individuo, la familia y la comunidad (1). En Colombia alrededor de dos millones y medio de personas presentan un consumo perjudicial, lo cual representa el 31% de los consumidores de alcohol y el 11% de la población entre 12 y 65 años (2).

El alto consumo de alcohol, causa neurotoxicidad y neuroadaptación (3-7). La alfa sinucleína (SNCA), se ha postulado como una proteína implicada en la sinapsis, plasticidad neuronal y diversas funciones en las neuronas dopaminérgicas, lo cual la vincula con el sistema de recompensa cerebral, que se ve alterado en las adicciones, particularmente en el alcoholismo (3). Adicionalmente, se ha demostrado la existencia del flujo de SNCA en dirección cerebro-sangre, como mecanismo regulador (8) y que permite su detección en fluidos humanos (9-16). Por esto, investigaciones en el área reportan expresión diferencial del gen que codifica para dicha proteína, asociada con la búsqueda y deseo compulsivo de alcohol "craving" (17), así mismo, estudios en ratas y primates no humanos indican claramente que la sobre expresión de alfa sinucleína en sangre resulta del consumo prolongado de alcohol (18,19) concluyendo que la elevación de niveles de ARNm en sangre es común en humanos, roedores y primates y que la alfa sinucleína podría ser útil como biomarcador periférico de alcoholismo crónico(17-19).

Por otro lado, el gen de SNCA es altamente polimórfico incluida su región promotora participante en el proceso de inicio y regulación de la transcripción, algunas de estas variantes se han relacionado con el alto consumo de alcohol. El

polimorfismo Rep1 en SNCA se encuentran asociados con fenotipos de uso, abuso, dependencia y búsqueda de alcohol (20), así mismo se han identificado 5 SNV's en esta región promotora del gen: rs7678651(C>A), rs7687945 (C>A,T), rs2736995 (A>C), rs2619364 (A>C,G), rs2301134 (A>G), asociados con el fenotipo de deseo (craving) de alcohol (21).

Teniendo en cuenta la influencia de SNCA en la actividad de la dopamina y las funciones de este neurotransmisor en la motilidad, se han establecido hipótesis sobre una posible relación intestino-cerebro, postulando que la acumulación de alfa sinucleína se inicia en el intestino y se propaga a través del sistema nervioso entérico hasta el sistema nervioso central (22,23), observando disminución de la motilidad intestinal y estreñimiento en modelos animales (24-30). Por lo tanto, pensando en una respuesta similar en humanos y el común denominador de la SNCA con el alcoholismo y estreñimiento planteamos el siguiente el objetivo de investigación: determinar la relación entre la expresión de la alfa sinucleína en sangre, los polimorfismos de nucleótido simple (SNV) en la región promotora del gen y el estreñimiento crónico en una muestra de población residente en Bogotá, D.C. con problemas de consumo de alcohol.

Materiales y metodos

Muestra de estudio

El trabajo de investigación corresponde a un estudio exploratorio observacional, tipo casos-controles, con una muestra a conveniencia. El estudio inicio con la participación de 306 sujetos residentes en la ciudad de Bogotá convocados por las redes sociales de la Universidad Nacional de Colombia, quienes respondieron la encuesta inicial para la aplicación de criterios de inclusión, exclusión y cuestionario

Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT), con el debido consentimiento informado. Al seleccionar por el puntaje AUDIT, 115 sujetos cumplían con los puntajes correspondientes al grupo control ≤ 2 puntos o grupo de casos ≥ 16 puntos (consumo perjudicial o de dependencia), los cuales fueron citados a la segunda fase para la toma de muestra de sangre, contando solamente con la participación de 62 individuos (35 sujetos en el grupo control y 27 sujetos en el grupo de casos) que conformaron la muestra final. Del muestreo se excluyeron aquellos sujetos con consumo de fármacos asociados al estreñimiento, antecedente de enfermedad hepática o esquema de tratamiento para el alcoholismo o enfermedades psiquiátricas.

Diagnóstico de estreñimiento crónico

Para el diagnóstico se aplicaron los criterios de Roma IV para estreñimiento (31) y con el fin de descartar síndrome de intestino irritable, también se aplicaron los criterios de Roma IV para esta patología, además se tuvo en cuenta información relacionada con la historia clínica.

Toma de muestra

Los participantes tuvieron un periodo de abstinencia de alcohol ≥ 48 horas, hasta la extracción de sangre periférica por venopunción, los cuales se recolectaron en tubos tapa lila con EDTA, de los 15ml obtenidos, 6 ml se destinaron para el aislamiento de células mononucleares y 9 ml para la extracción del ADN. El plasma obtenido mediante el gradiente de densidad se conservó a -80°C para su empleo en la prueba de ELISA para proteínas.

Análisis de expresión génica de ARNm

Para analizar la expresión de ARNm, se realizó aislamiento de células mononucleares, mediante el gradiente de densidad con el reactivo Histopaque-077 (Sigma-Aldrich), la extracción de ARN total se realizó mediante el kit de extracción PureLink® RNA mini kit (Thermo Fischer Scientific) o con el método trizol-cloroformo con el reactivo RiboZol™. La reacción de transcripción reversa se realizó con el producto High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Thermo Fischer scientific) con las siguientes condiciones 1) 25°C x 10 min, 2) 37°C x 120 min, 3) 85°C x 5 min y 4) 4°C ∞, por último, la expresión de los genes fueron evaluados mediante qPCR utilizando una concentración de 1ng/μl para todas las muestras de ADNc, la cual se encontraba dentro del rango dinámico estandarizado con una eficiencia de amplificación de *SNCA* de 2.18 y utilizando los primer's de diseño propio empleando la herramienta primer-blast que está disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

F:GCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGC y R: TGTTGCCACACCATGCACCACTCC a una concentración de 0.125 μM. Para el caso del gen normalizador

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), se obtuvo una eficiencia de 1.98 y se utilizaron primer's estándar a una concentración de 0.25μM,

F:CACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTA y

R:CCTTGACGGTGCCATGGAATTTGC. Adicionalmente, se utilizó una muestra calibradora interplaca, obtenida de una mezcla en iguales proporciones de ADNc del grupo de casos y controles. La reacción se llevó a cabo mediante el Kit Luna® Universal qPCR Master Mix, cada muestra se realizó por triplicado (técnico) teniendo en cuenta las siguientes condiciones: 1) un ciclo de desnaturalización

inicial 95°C por 300 segundos. 2) 45 ciclos, desnaturalización 95°C por 15 segundos y amplificación 65°C durante 30 segundos. 3) Ciclo de Melting, 95°C durante 10 segundos, 65°C por 60 segundos y 97°C por 1 segundo. 4) ciclo de enfriamiento "cooling" a 37°C. Finalmente con las eficiencias de cada gen y los Cq obtenidos, se realizó la conversión a tasa de expresión.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La cuantificación de proteína, se realizó mediante el kit Alpha-synuclein (SNCA) (Human) ELISA de BioVision Incorporated, con sensibilidad < 9.375 pg/ml y un rango de detección entre 15.6-1000 pg/ml. Se realizó la lectura a 450 nm con una ventana de tiempo 20 minutos, para esta lectura se utilizó el equipo Thermo scientific Multiskan FC®. Cada muestra se realizó por triplicado y la curva estándar se preparó con una serie de 8 diluciones de 300µl, con concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32.1 y 15.6 pg/ml.

Evaluación de polimorfismos de nucleótido simple SNV's

Se realizó extracción de ADN, mediante la técnica Salting out. Para la identificación de SNV's de la región promotora de SNCA se realizó PCR convencional con primer's de diseño propio empleando la herramienta primer-blast que está disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. La secuencia de los primer's fue la siguiente:

F: CCGCTTGTTTTAGACGGCTG y R: GTCACGAGCACTCTTGTTGGA, para un segmento de 561pb comprendido entre los nucleótidos -1738 y -2299 de la región promotora del gen. Posterior a la PCR, se realizó purificación de los productos con acetato de sodio 3M y etanol absoluto para luego realizar secuenciación por el método Sanger empleando el primer Forward por lo que se obtuvo la secuencia de

la hebra nocodificante. La visualización de los electroferogramas se realizó mediante el software BioEdit Sequence Alignment Editor disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html> y el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia se realizó con la herramienta BLAST2 disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas SPSS (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) y GraphPad Prism ® (GraphPad Software, Inc). Para determinar la distribución de datos se realizó la prueba de Shapiro Wilk, y la prueba Kolmogorov-Smirnov. Para esta investigación se estableció un nivel de significancia $\alpha=0.05$ y todas las pruebas fueron realizadas a dos colas. Se emplearon la prueba Mann Whitney, prueba ANOVA de dos factores con test post hoc de Bonferroni, prueba de Friedman y se utilizó el test exacto de Fisher y test chi cuadrado.

Consideraciones éticas

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, mediante acta de evaluación 014-224B-17 del 28 de septiembre de 2017, y todos los sujetos aceptaron voluntariamente su participación en el estudio, mediante consentimiento informado.

Resultados

Descripción de los sujetos de estudio

La edad de los individuos presentó características similares, con una media de 24 \pm 4 años para el grupo control y 23 \pm 4 años para el grupo de casos. La participación tuvo un porcentaje de 46.8% para mujeres y 53.2% para hombres.

Adicionalmente nuestro universo correspondió a personal vinculado con la Universidad Nacional de Colombia con una participación mayoritaria de estudiantes universitarios.

Teniendo en cuenta las unidades de bebida estándar y el volumen de un trago por bebida, en un día habitual de consumo de alcohol, los sujetos del grupo de casos consumieron en promedio de 192-244 g para hombres y mujeres respectivamente y en el grupo control en promedio de 23-37g para hombres y mujeres respectivamente.

Expresión de ARNm de SNCA en células mononucleares de sangre

En este ensayo, por algunas limitaciones técnicas, fue analizada una muestra de 25 sujetos del grupo control y 25 sujetos del grupo de casos. La tasa de expresión fue obtenida mediante el Cq, mostró un incremento de la expresión de ARNm de SNCA en el grupo de casos con diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($P= 0.0099$) (figura 1).

La expresión génica de acuerdo al sexo, presentó una media para el sexo femenino de 0.465 para los controles y 1.208 para los casos; para el sexo masculino, fue de 0.378 y 1.346 para controles y casos respectivamente.

Cuantificación de la proteína SNCA en plasma

Para este análisis, se empleó el plasma de 34 sujetos del grupo control y 27 sujetos del grupo de casos. Los resultados muestran un valor promedio mayor en los niveles de la proteína en plasma en el grupo de casos (199.3 pg/ml) respecto al grupo de controles (180.9 pg/ml), sin diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.7112$) (figura 2).

Frecuencia de SNV's en la región promotora del gen SNCA

Para este ensayo, se evaluaron 31 sujetos del grupo control y 25 del grupo de casos. En general no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de consumo (controles-casos), para ninguno de los nueve polimorfismos estudiados en el segmento de la región promotora de *SNCA*.

La secuenciación de ADN se determinó en la hebra no codificante y por tanto complementaria a los reportados en las bases de datos. De los polimorfismos previamente reportados y relacionados con el consumo de alcohol, se encontró para el polimorfismo rs2619363 (G>C,T), una mayor frecuencia en el genotipo [C/C], seguida del genotipo heterocigoto [C/A], sin observar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,77$). Para el polimorfismo rs2301134 (A>G), hay distribución de las frecuencias en los 3 genotipos [C/C], [C/T] y [T/T], con mayor frecuencia del genotipo heterocigoto [C/T] para los controles, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p=0.11$) (cuadro 1).

Adicionalmente, los 6 polimorfismos previamente identificados en el segmento analizado, rs542037441 (G>T), rs989496677(C>T), rs927159023 (G>C), rs924048579 (G>C), rs950036657 (G>A), rs916862395 (G>C,T), resultaron ser monomórficos del tipo homocigoto [G/G], [C/C], [C/C], [C/C], [G/G] y [C/C] respectivamente en los dos grupos evaluados y en el 100% de los participantes del estudio.

Por otro lado, en esta investigación se identificó un SNV en la posición -2171 de la región promotora del gen *SNCA*, el cuál presenta alta frecuencia en los dos grupos y actualmente no se encuentra reportado en GenBank (NCBI). En este polimorfismo, se observa una mayor frecuencia en el genotipo heterocigoto [T/A]

para los dos grupos, sin diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p=0,14$).

Presencia de estreñimiento crónico en la población seleccionada

De acuerdo con la aplicación del algoritmo para el diagnóstico del estreñimiento crónico, esta investigación encontró diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de estreñimiento crónico por grupos de consumo de alcohol ($p=0,011$), observando un riesgo 4.8 veces mayor de presentar estreñimiento en las personas con problemas de consumo de alcohol (OR= 4,8; IC 1,43-16,2) (figura 3). La aplicación de los criterios diagnósticos de Roma IV del síndrome de intestino irritable, fue realizada con el fin de descartar alguna relación entre la presencia de síntomas típicos del estreñimiento crónico y síntomas del síndrome de intestino irritable

Asociación entre el nivel de proteína SNCA y la prevalencia de estreñimiento crónico

En este análisis se evaluaron 34 sujetos en el grupo control y 27 en el grupo de casos. En general, no hay relación del diagnóstico de estreñimiento crónico y el consumo de alcohol como factores separados, ni en la interacción de los mismos sobre el nivel de proteína SNCA ($p= 0,982$).

Asociación entre la expresión del gen alfa sinucleína en forma de ARNm y la prevalencia de estreñimiento crónico

Esta prueba analizó 25 sujetos en cada grupo de estudio. Se observó un incremento de la expresión de SNCA en los sujetos con alto consumo de alcohol cuando había diagnóstico de estreñimiento crónico (figura 4); no obstante, no se encontró diferencia estadística significativa para esta interacción (cuadro 2).

Relación entre la expresión del gen de SNCA y los SNV's

En esta prueba fueron analizados 3 polimorfismos de los 9 evaluados, teniendo en cuenta que 6 fueron mono-mórficos para la población estudiada. El SNV en la posición -2171, de acuerdo con la prueba post hoc de Bonferroni, muestra una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de SNCA entre el grupo de casos y controles, para sujetos que presentan el genotipo AT ($p < 0.01$) (figura 5).

Discusión

Para esta investigación, se utilizó la herramienta AUDIT, que internacionalmente se encuentra validada por la organización mundial de la salud (32) y para Colombia por Campo y Ospina (33,34). De acuerdo con la OMS los criterios del AUDIT tienen en cuenta que el consumo perjudicial corresponde a 40 g diarios en mujeres y mayor a 60 g diarios en hombres, y el consumo de dependencia de más de 60 g para ambos sexos (35). Al comparar estos criterios, con lo reportado en un día habitual de consumo por los sujetos de esta investigación, se observó un consumo muy superior al establecido en el grupo de casos.

La expresión de ARNm del gen *SNCA* en células mononucleares de sangre periférica, en esta investigación fue significativamente mayor en el grupo de casos ($p=0.0099$), similar a lo reportado por Walker & Grant (2006) que evaluó la expresión de ARNm del gen *SNCA* por medio de microarreglos, en primates alcohólicos, con autoadministración de alcohol por un periodo de 18 meses, resultando en un incremento 3,21 veces mayor de los niveles de ARNm en sangre periférica respecto a los controles ($p < 0.0001$)(19). Es importante tener en cuenta que para el presente estudio, los sujetos del grupo de casos presentaron una

abstinencia de consumo de 48 horas previas a la extracción de sangre, en comparación con los primates no humanos de la investigación mencionada que contaron con alcohol disponible hasta el último momento, midiendo tanto el efecto crónico como agudo; por lo tanto, en este caso particular y bajo las mismas condiciones, es posible que el nivel de expresión en humanos se vea aún más incrementado.

En otros estudios con humanos, fue evaluada la expresión génica de *SNCA* en sangre con un periodo de abstinencia de 24-72 horas, evidenciando un aumento significativo de la expresión en el grupo de pacientes con alcoholismo ($p=0.021$)(17); sin embargo, este trabajo de Bonsch y colaboradores (2004) fue realizado únicamente con sujetos de sexo masculino, y aunque en nuestra investigación el grupo de casos estaba conformado por 17 hombres y 8 mujeres, fue observado un aumento de expresión de 1.1 veces en hombres comparados con las mujeres.

Por otro lado, aunque la concentración de la proteína a nivel de plasma se muestra incrementada (199.3 pg/ml) respecto al grupo control (180.9 pg/ml), estas no son diferencias estadísticamente significativas ($p=.07112$). Contrario, a lo evidenciado por Bonsch, que reporta aumento significativo de la proteína en personas con abstinencia de 24-72 horas (14.33ng/ml), comparado con controles sanos (5.92ng/ml) ($p < 0.0001$) (36).

En este caso, el incremento en la concentración de la proteína no es estadísticamente significativo comparándolo con los niveles de expresión del ARNm de *SNCA*, quizás el fenómeno se puede explicar por varias razones: en primer lugar las determinaciones se realizaron en compartimentos diferentes, el

ARNm se determinó en lisados de células mononucleares de sangre periférica mientras que la proteína se determinó en plasma, y no necesariamente tendrían que ser concordantes, hecho demostrado en diferentes tejidos, regiones cerebrales(4,8,9). Otras posibles explicaciones podrían estar relacionadas con mecanismos de regulación pos- transcripcionales que impiden la traducción eficaz del ARNm (37,38). Tal es así, que los cambios post-transcripcionales del ARNm de *SNCA* se encuentran regulados por la presencia varios microARNs, particularmente de: mir-7 y mir-153, que se unen a la región 3'-UTR de *SNCA* y cuya expresión es inversamente proporcional a la expresión de ARNm y proteína (39,40).

Con respecto a los nueve polimorfismos de nucleótido simple identificados, los hallazgos previos, informaron asociación entre la presencia del polimorfismo rs2619363 con el fenotipo de deseo de alcohol "craving" ($p= 0,01$); sin embargo, en el presente estudio, no se observó dicha diferencia ($p=0,77$). En cuanto al polimorfismo rs2301134, esta investigación no encontró diferencias entre las personas con abstinencia ≥ 48 horas y sujetos control ($p=0,11$), al igual que la investigación de Foroud et al (2007) que no encontró relación entre este SNV y el fenotipo de deseo compulsivo de alcohol ($p= 0.69$)(21), que está altamente vinculado con la dependencia al alcohol y se da en periodos de abstinencia al mismo. Los polimorfismos monomórficos identificados en nuestra muestra presentan frecuencias similares a las reportadas mundialmente y no presentan evidencia de una posible vinculación con el consumo de alcohol.

Por otro lado, esta investigación identificó un SNV en la posición -2171 del promotor del gen *SNCA* para el cual, en los dos grupos evaluados se observó una

mayor frecuencia del genotipo heterocigoto [A/T]. Este SNV no se encuentra reportado en GenBank (NCBI) como variante, por lo que el análisis del mismo puede ser de utilidad para futuras investigaciones. Esta variante SNV -2171 presento una diferencia significativa para el genotipo heterocigoto [A/T], observando un incremento de la expresión génica de ARNm en el grupo de casos ($p < 0,01$). No se han encontrado investigaciones previas que evalúen la relación entre la expresión del gen y los SNV's mencionados en el promotor. Es importante recordar que el promotor es la región del gen donde se ensambla la maquinaria transcripcional y que cambios en los nucleótidos pueden aumentar o disminuir la afinidad por los factores proteicos participantes y por tanto afectar la tasa de transcripción y en nuestro caso el SNV -2171 [A/T] puede estar relacionado con ese aumento en la expresión de SNCA en el grupos de casos.

Por otro lado, la presencia de estreñimiento se vinculó con un riesgo 4.8 veces mayor en sujetos con problemas de consumo de alcohol ($p=0,011$); sin embargo, no se mostró relación con la sobreexpresión de SNCA. Se debe tener en cuenta que los estudios previos fueron realizados en modelo animal con modificación genética para sobre expresar ARNm e incrementar niveles proteicos de SNCA (24-30). En estos modelos de animales, se ha observado reducción en el número de pellets fecales, aumento de 2.2 veces el tiempo de expulsión, contenido fecal 2.9 veces mayor y alteración en los estímulos defecatorios que se definen como estreñimiento (27,28,41,42) y posiblemente se relacione con el postulado de Sharma et al (2018), que explica la presencia de estreñimiento, mediante la disbiosis que afecta el epitelio del colón, lo que permite que los agregados de SNCA puedan infiltrarse a través del sistema nervioso entérico hasta llegar al

sistema nervioso central (43). En nuestro estudio observacional se evidencia que hay una diferencia en la expresión del ARNm de SNCA más no en la proteína que finalmente por su acumulación y agregación causa los efectos motores y no-motores (entre ellos el estreñimiento) ya descritos para las alfa sinucleopatías. Por las tasas de transcripción observadas es poco probable que existan agregados de SNCA (se requieren altas concentraciones) que puedan infiltrarse en el epitelio intestinal y causar síntomas relacionados con el estreñimiento.

Hasta la fecha este es el primer estudio que intenta evidenciar esta relación, por lo cual se requiere más investigación *in vivo* e *in vitro*, de tipo observacional y de intervención con nuevos diseños experimentales ajustados para responder este cuestionamiento.

El consumo crónico de alcohol finalmente tiene manifestaciones psiquiátricas, psicológicas y biológicas similares a otras enfermedades neurodegenerativas.

Nuestros resultados no concuerdan con lo observado en pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), una patología que también presenta niveles incrementados de la SNCA, en donde se ha observado que el estreñimiento es frecuente y generalmente precede a los síntomas clínicos propios de la enfermedad, por esta razón se ha asociado la frecuencia de evacuaciones intestinales con el riesgo futuro de tener EP, encontrando que aquellas personas con menos de una evacuación por día, presentan un riesgo de 2,7 a 4,5 veces mayor (44) e incluso que aquellos que presentan estreñimiento como antecedente tienen un estadio más severo de la enfermedad (45); no obstante, aunque en las dos patologías Parkinson y alcoholismo, hay incremento de SNCA y daños cerebrales, puede que la presencia de estreñimiento en el Parkinson sea debido a

otros factores diferentes a los del alcoholismo que aún no se han identificado, incluso no relacionados con el cambio de permeabilidad en el intestino y cambio de la biota intestinal por acción del alcohol como se ha empezado a esclarecer (46) y sean más relacionadas con otras alteraciones en las vías dopaminérgicas que juegan un papel importante en la motilidad intestinal.

Esta investigación evidenció sobreexpresión de ARNm del gen SNCA en células mononucleares de sujetos con problemas de consumo de alcohol, que no se relacionó con el nivel plasmático de la proteína. Adicionalmente, en el grupo con alto consumo de alcohol, se encontró un mayor riesgo de presentar estreñimiento, el cual no se relacionó con la expresión diferencial de ARNm de SNCA. Por otro lado, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de los SNV's encontrados y se identificó un SNV en la posición -2171, que no presenta reporte previo como variante en GenBank y cuyo genotipo [A/T] parece contribuir al incremento de la expresión génica de SNCA.

Agradecimientos

Agradecemos a los voluntarios del estudio, a los estudiantes de pregrado y posgrado del Semillero de Investigación, subgrupo de Genética de las Adicciones, Grupo de Genética Clínica y a todo el personal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, que de una u otra forma han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores de esta publicación no presentan conflicto de interés.

Financiación

Esta publicación es producto de los compromisos adquiridos en la convocatoria

interna de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018 con el proyecto titulado: “Estudio de genes de neuroinflamación, su expresión y estado de metilación en sujetos alcohol-dependientes colombianos” código Hermes 34776.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial para reducir el uso nocivo del alcohol. Ginebra: OMS; 2010. p. 1-46. Fecha de consulta: 5 de enero de 2018. Disponible en:
https://www.who.int/substance_abuse/activities/msbalcstrategies.pdf
2. Observatorio de Drogas de Colombia. Estudio de consumo de sustancias psicoactivas en Colombia, 2013. p. 1-182. Fecha de consulta: 5 de enero de 2018. Disponible en:
https://www.unodc.org/documents/colombia/2014/Julio/Estudio_de_Consumo_UNODC.pdf
3. Serecigni J. Neurobiología del alcoholismo. *Psicología desde el Caribe*. 2013;30:21-35.
4. Janeczek P, Lewohl J. The role of a-synuclein in the pathophysiology of alcoholism. *Neurochem Int*. 2013;63:154-62.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.007>
5. Swant J, Goodwin J, North A, Ali A, Gamble J, Chirwa S, *et al*. a-synuclein stimulates a dopamine transporter-dependent chloride current and modulates the activity of the transporter. *J Biol Chem*. 2011;286:43933-43.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241232>
6. Liang T, Carr LG. Regulation of alpha-synuclein expression in alcohol-

preferring and -non preferring rats. *J Neurochem.* 2006;99:470-82.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04111.x>

7. Butler B, Saha K, Rana T, Becker JP, Sambo D, Davari P, *et al.* Dopamine transporter activity is modulated by α -synuclein. *J Biol Chem.* 2015;290:29542-54.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691592>

8. Sui Y, Bullock K, Erickson M, Zhang J, Banks W. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood-brain barrier. *Peptides.*

2014;62:197-202. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.018>

9. Lööv C, Scherzer CR, Hyman BT, Breakefield XO, Ingelsson M. α -synuclein in extracellular vesicles: functional implications and diagnostic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36:437-48. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0317-0>

10. Simonsen A, Kuiperij B, El-Agnaf A, Omar M, Engelborghs S, Herukka S-K,

et al. The utility of α -synuclein as biofluid marker in neurodegenerative diseases: a systematic review of the literature. *Biomark Med.* 2016;10:19-34.

<https://doi.org/10.2217/BMM.14.105>

11. Omar M, Agnaf E, Salem S, Paleologou K, Cooper L, Fullwood N, *et al.*

Synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 2003;17:1945-7.

<https://doi.org/10.1096/fj.03-0098fje>

12. Henchcliffe C. Blood and cerebrospinal fluid markers in Parkinson's

disease : current biomarker findings. *Curr Biomark Find.* 2015;5:1-11.

<https://doi.org/10.2147/CBF.S50424>

13. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, *et al.*

Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease,

in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358:104-10.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.108>

14. Abd-Elhadi S, Honig A, Simhi-Haham D, Schechter M, Linetsky E, Ben-Hur T, *et al.* Total and proteinase K-resistant α -synuclein levels in erythrocytes, determined by their ability to bind phospholipids, associate with parkinson's disease. *Sci Rep.* 2015;5:1-12. <https://doi.org/10.1038/srep11120>

15. Kang W, Chen W, Yang Q, Zhang L, Zhang L, Wang X, *et al.* Salivary total α -synuclein, oligomeric α -synuclein and SNCA variants in Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* 2016;6:1-8. <https://doi.org/10.1038/srep28143>

16. Wang X, Yu S, Li F, Feng T. Detection of α -synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2015;599:115-9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.030>

17. B nsch D, Reulbach U, Bayerlein K, Hillemacher T, Kornhuber J, Bleich S. Elevated alpha synuclein mRNA levels are associated with craving in patients with alcoholism. *Biol Psychiatry.* 2004;56:984-6.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.09.016>

18. Ziolkowska B, Gieryk A, Wawrzczak-Bargiela A, Krowka T, Kaminska D, Korkosz A, *et al.* α -Synuclein expression in the brain and blood during abstinence from chronic alcohol drinking in mice. *Neuropharmacology.* 2008;54:1239-46.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.04.001>

19. Walker S, Grant K. Peripheral blood α -synuclein mRNA levels are elevated in cynomolgus monkeys that chronically self-administer ethanol. *Alcohol.*

2006;38:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.03.008>

20. B nsch D, Lederer T, Reulbach U, Hothorn T, Kornhuber J, Bleich S. Joint

analysis of the NACP-REP1 marker within the alpha synuclein gene concludes association with alcohol dependence. *Hum Mol Genet.* 2005;14:967-71.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi090>

21. Foroud T, Wetherill LF, Liang T, Dick DM, Hesselbrock V, Kramer J, et al. Association of alcohol craving with a-synuclein (SNCA). *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31:537-45. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00337.x>

22. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm.* 2003;110:517-36. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>

23. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord.* 2012;27:716-9. <https://doi.org/10.1002/mds.25020>

24. Chesselet MF, Richter F, Zhu C, Magen I, Watson MB, Subramaniam SR. A progressive mouse model of Parkinson's disease: The Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics.* 2012;9:297-314. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0104-2>

25. Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, et al. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing a-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res.* 2002;68:568-78. <https://doi.org/10.1002/jnr.10231>

26. Verbaan D, Marinus J, Visser M, Van Rooden SM, Stiggelbout AM, Van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology.* 2007;69:333-41. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000266593.50534.e8>

27. Wang L, Magen I, Yuan PQ, Subramaniam SR, Richter F, Chesselet MF, et

- al. Mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein display alterations in colonic myenteric ganglia and defecation. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24:1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01974.x>
28. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, *et al.* Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell.* 2016;167:1469-80.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
29. Engen P, Green S, Voigt R, Forsyth C, Keshavarzian A. The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol Res.* 2015;37:223-36. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4342.9285>
30. Yan A, Fouts D, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, *et al.* Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2011;53:96-105. <https://doi.org/10.1002/hep.24018>
31. Domingo J. The new Rome criteria (IV) of functional digestive disorders in clinical practice. *Med Clin (Barc).* 2017;148:464-8 <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.12.020>
32. Babor T, Higgins J, Saunders J, Monteiro M. Cuestionario de Identificación de los trastornos debidos al consumo de alcohol. Ginebra: OMS; 2001.p. 1-40.
33. Campo A, Villamil M, Herazo E. Confiabilidad y dimensionalidad del AUDIT en estudiantes de medicina. *Psicol desde el Caribe.* 2013;30:21-35.
34. Ospina J, Manrique F, Ariza N. Confiabilidad y dimensionalidad del cuestionario para identificación de trastornos debidos al consumo de alcohol (audit) en estudiantes universitarios de tunja (Colombia). *Salud Uninorte.* 2012;28:276-82.

35. Anderson P, Gual L, Colón J. Alcohol y atención primaria de la salud alcohol y atención primaria de la salud. Washington, D.C.: OPS; 2008.
36. Bönsch D, Greifenberg V, Bayerlein K, Biermann T, Reulbach U, Hillemacher T, *et al.* α -Synuclein protein levels are increased in alcoholic patients and are linked to craving. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29:763-5.
<https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000164360.43907.24>
37. Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 2003;300:805-8.
<https://doi.org/10.1126/science.1082320>
38. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell.* 2007;25:635-46.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
39. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of a-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem.* 2010;285:12726-34.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086827>
40. McMillan K, Murray T, Bengoa N, Cordero O, Cooper J, Buckley A, *et al.* Loss of microRNA-7 regulation leads to α -synuclein accumulation and dopaminergic neuronal loss in vivo. *Mol Ther.* 2017;25:2404-14.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.08.017>
41. Wang L, Fleming S, Chesselet M, Taché Y. Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type α -synuclein. *Neuroreport.* 2008;19:873-6.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282ffda5e>
42. Kuo Y, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani A, Morrison B, *et al.* Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes

containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet.* 2010;19:1633-50.

<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282ffda5e>

43. Sharma A, Kurek J, Morgan JC, Wakade C, Rao SS. Constipation in Parkinson's disease: a nuisance or nuanced answer to the pathophysiological puzzle? *Curr Gastroenterol Rep.* 2018;20:1. <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0609-x>.

44. Abbott R, Petrovitch H, White L, Masaki K, Tanner C, Curb J, *et al.* Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology.* 2001;57:456-62. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.5.838-a>

45. Rodríguez O, Torres L, Meza K, López R, Ruiz H, Cosentino C. Estreñimiento como factor asociado a mayor severidad en pacientes con enfermedad de Parkinson del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas del Perú. *Diagnóstico.* 2019;57:180-3. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v57i4.169>

46. Leclercq S, De Timary P, Delzenne N, Stärkel P. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry.* 2017;7:e1048). <https://doi.org/10.1038/tp.2017.15>.

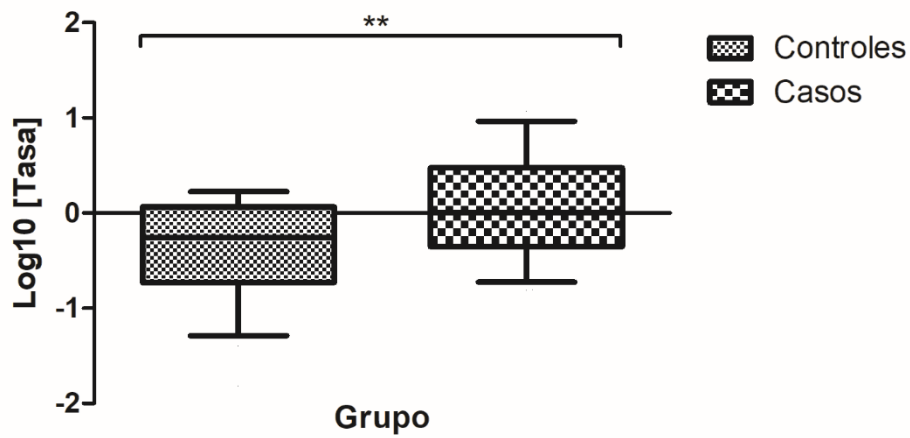


Figura 1. Nivel de expresión de ARNm del gen *SNCA* en células mononucleares de sangre periférica. Los valores son presentados en box plot, mostrando el rango del percentil 10 al 90, con la línea que representa la mediana. **p-valor= 0.0099 de acuerdo a la prueba Mann Whitney; n= 25 sujetos en cada grupo.

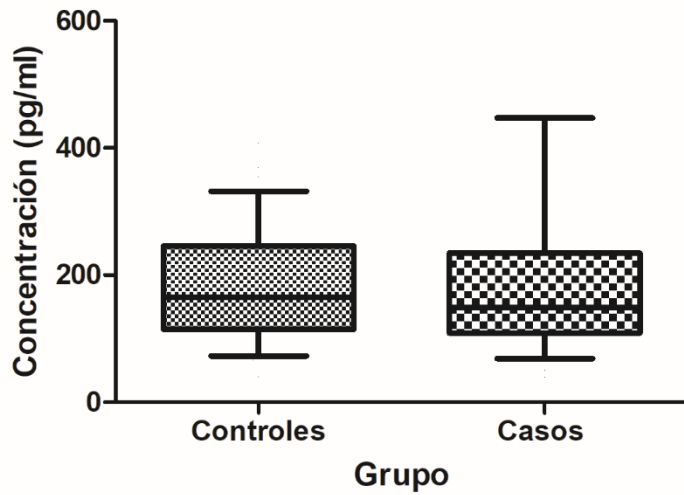


Figura 2. Concentración de la proteína SNCA en plasma sanguíneo. Los valores son presentados en box plot, mostrando el rango del percentil 10 al 90, con la línea que representa la mediana. p-valor= 0.7112 de acuerdo a prueba Mann Whitney; n= 34 sujetos grupo control y n=27 en el grupo de casos.

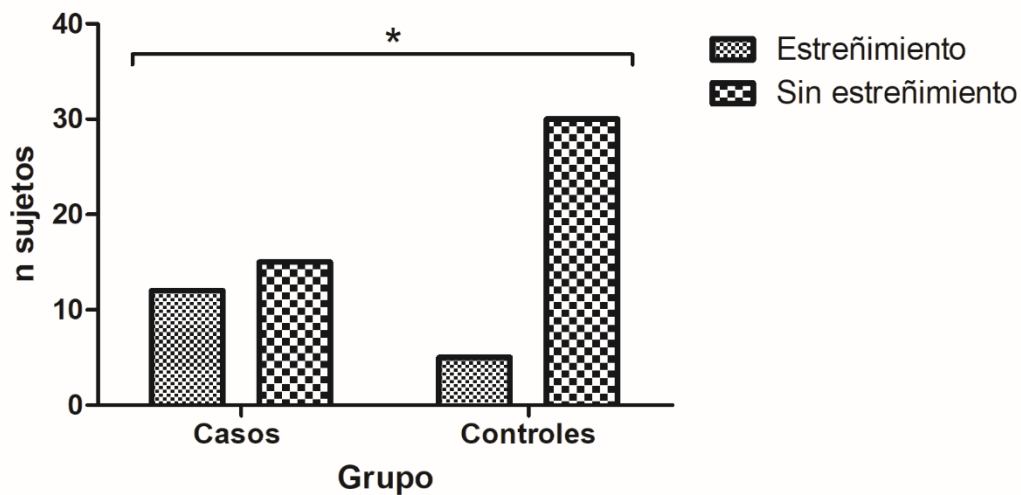


Figura 3. Presencia de estreñimiento crónico en los sujetos de investigación. Los valores corresponden a la frecuencia. *p-valor= 0.011 de acuerdo a la prueba exacta de Fisher; OR= 4.8, (IC 1.43-16.2). Grupo de controles n=5 con estreñimiento y n=30 sin estreñimiento. Grupo de casos n=12 con estreñimiento y n=15 sin estreñimiento.

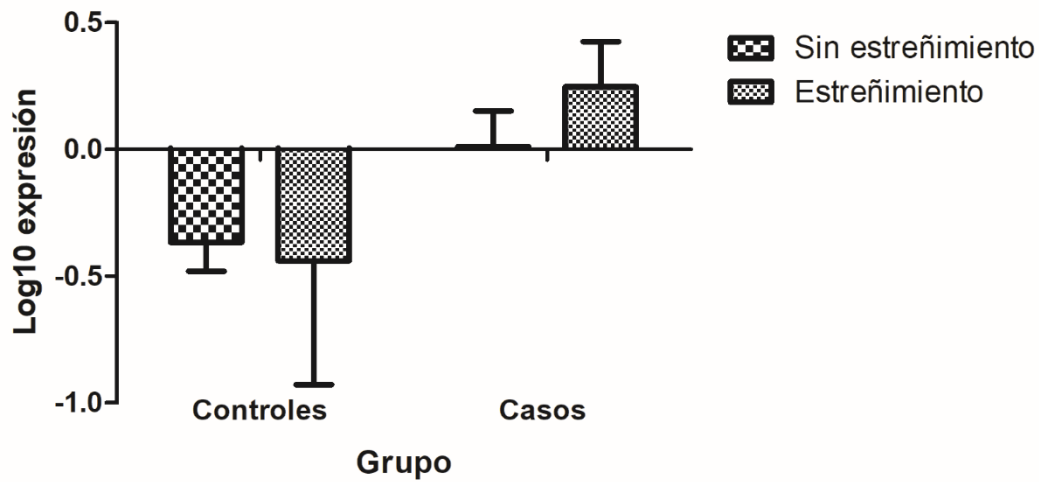


Figura 4. Expresión del gen *SNCA* de acuerdo al diagnóstico de estreñimiento crónico. Los valores corresponden a la media, $p= 0.460$ de acuerdo a la prueba de ANOVA de dos factores. Grupo de controles $n=3$ con estreñimiento y $n= 22$ sin estreñimiento. Grupo de casos $n=11$ con estreñimiento y $n= 14$ sin estreñimiento.

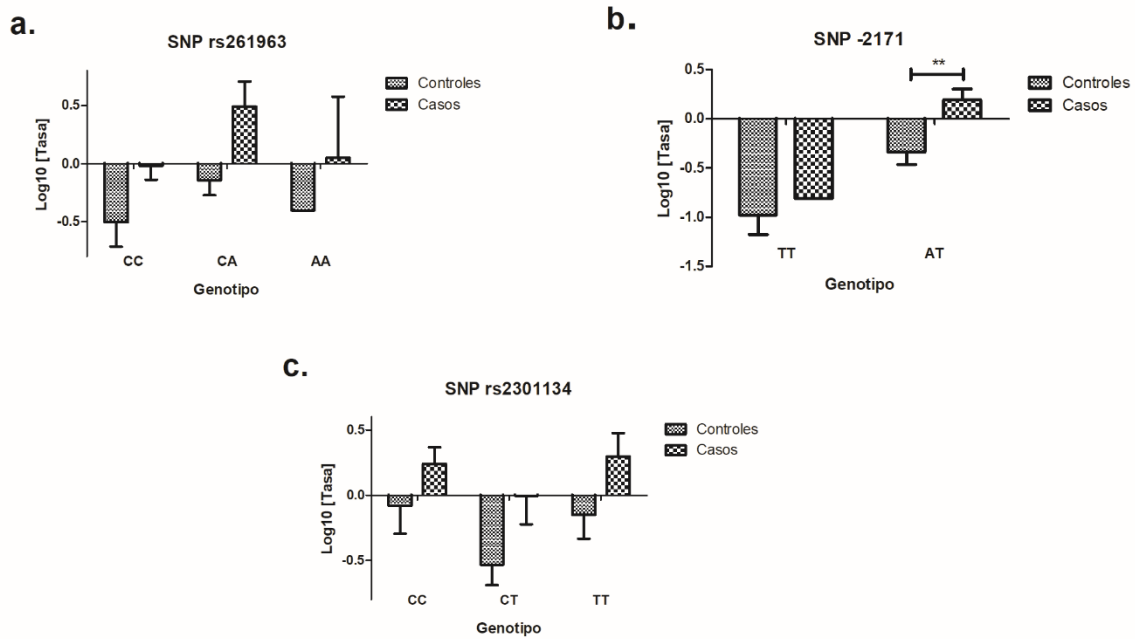


Figura 5. Tasa de expresión de *SNCA* según el genotipo de tres SNVs. Los valores corresponden a la media con su respectiva DE. **a.** tasa de expresión según el genotipo del SNV rs261963, $p=0.920$. **b,** tasa de expresión según el genotipo del SNV -2171, $p=0.581$, de acuerdo a la prueba pos hoc, $**p < 0.01$ para el genotipo AT entre los dos grupos **c,** tasa de expresión según el genotipo del SNV rs2301134, $p=0.875$. $n= 34$ sujetos grupo control y $n=27$ en el grupo de casos.

Cuadro 1. Frecuencia de genotipos y alelos de diferentes SNV's de la región promotora del gen *SNCA* (-1738 y -2299) secuenciados en la hebra no-codificante.

SNV's	N	Genotipo % (N)			Alelos % (N)	
rs2619363 (-2229)		C/C	C/A	A/A	C	A
Controles	27	63 (17)	33,3 (9)	3,7 (1)	80 (44)	20 (11)
Casos	24	62,5 (15)	29,2 (7)	8,3 (2)	77,1 (37)	22,9 (11)
P valor (<0,05)			0,77		0,72	
rs542037441 (-2195)		C/C	C/A	A/A	C	A
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	
rs989496677 (-2185)		G/G	G/A	A/A	G	A
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	
SNV(-2171)		T/T	T/A	A/A	T	A
Controles	31	16,1 (5)	83,9 (26)	0	58,1 (36)	41,9 (26)
Casos	25	4,4 (1)	96,0 (24)	0	52 (26)	48 (24)
P valor (<0,05)			0,14		0,52	
rs927159023 (-2159)		C/C	C/G	G/G	C	G
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	
rs924048519 (-2141)		C/C	C/G	G/G	C	G
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	
rs2301134 (-2127)		C/C	C/T	T/T	C	T
Controles	31	19,4 (6)	67,7 (21)	12,9 (4)	53,2 (33)	46,8 (29)
Casos	25	32 (8)	40 (10)	28 (7)	52 (26)	28 (24)
P valor (<0,05)			0,11		0,90	
rs950036657 (-2120)		C/C	C/T	T/T	C	T
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	
rs916862395 (-2111)		C/C	C/G	G/G	C	G
Controles	31	100 (31)	0	0	100 (62)	0
Casos	25	100 (25)	0	0	100 (50)	0
P valor (<0,05)			>0,99		>0,99	

Cuadro 2. Expresión (log10) del gen *SNCA* de acuerdo al diagnóstico de estreñimiento crónico

	Controles	Casos	Diferencia	IC	P valor
Estreñimiento	-0.4396	0.2463	0.6859	-0.1663 a 1.538	> 0.05
Sin estreñimiento	-0.3667	0.01003	0.3767	-0.07064 a 0.8241	> 0.05

Los valores corresponden al test posthoc de Bonferroni. Aplicado posteriormente a la prueba ANOVA de dos vías con $p=0.460$.