

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DOUTORADO EM CLÍNICA MÉDICA

**VANESSA ARGONDIZO DOS SANTOS**

**INTER-RELAÇÕES ENTRE TABAGISMO, SINTOMAS  
DEPRESSIVOS E GENÉTICA**

Porto Alegre  
2011

**VANESSA ARGONDIZO DOS SANTOS**

**INTER-RELAÇÕES ENTRE TABAGISMO, SINTOMAS DEPRESSIVOS  
E GENÉTICA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutorado, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Dr. JOSÉ MIGUEL CHATKIN**

**Co-orientador: Dr. NOE ZAMEL**

Porto Alegre

Junho 2011

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

S237i Santos, Vanessa Argondizo dos Santos  
Inter-relações entre tabagismo, sintomas depressivos e genética /  
Vanessa Argondizo dos Santos. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

109 p.: il. tab. Inclui um artigo de periódico submetido à publicação e um publicado: dos Santos VA, Migott AM, Bau CH, Chatkin JM. Tobacco smoking and depression: result of cross-sectional study. Br J Psychiatry. 2010 Nov;197:413-4.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Chatkin.  
Coorientador: Prof. Dr. Noe Zamel.

Doutorado (Tese) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. TABAGISMO. 2. SINTOMAS DEPRESSIVOS. 3. FATORES DE RISCO. 4. POLIMORFISMO GENÉTICO. 5. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. 6. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Chatkin, José Miguel. II. Zamel, Noe. III. Título.

C.D.D. 613.85  
C.D.U. 613.84: 616.89-008.454(043.2)  
N.L.M. WM 290

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha **família** que me oportunizou educação e fez-me ser a pessoa que sou hoje.

Ao meu esposo **Eduardo**, que com muita paciência soube administrar a distância, a saudade, minhas ansiedade e dúvidas. Agradeço imensamente teu companheirismo e dedicação.

Aos meus orientador **Dr. José Miguel Chatkin** e co-orientador **Dr. Noe Zamel**, agradeço pela oportunidade única de me proporcionarem realizar parte do meu Doutorado em convênio com a Universidade de Toronto. Obrigada pela orientação e dedicação de vocês com a realização do projeto.

À **Dra. Katherine Siminovitch**, coordenadora do laboratório na Universidade de Toronto, juntamente com sua equipe, por terem me recebido e colaborado na execução do projeto e análise dos dados.

Ao **Dr. Claiton Bau**, agradeço pela contribuição na elaboração dos artigos e pelas tantas reuniões que proporcionaram uma maior discussão sobre tópicos chave da Tese.

À **Dra. Denise Cantarelli Machado**, obrigada por ceder seu laboratório para a realização de parte dos experimentos. Agradeço também a ajuda dos meus colegas de laboratório.

À **PROBOLSA** e **CAPES** (Bolsa de Doutorado Sanduíche) por me proporcionarem as bolsas de estudo que custearam, respectivamente, o curso e minha estada no exterior.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Medicina, **Vanessa** e **Ernesto**, bem como a **Eloá**, secretária do Dr. Chatkin, que sempre se mostraram prestativos e empenhados em resolver o que era solicitado. Agradeço também a **Nóris** pelo auxílio no envio das amostras para Toronto.

Aos funcionários do **Banco de Sangue** do Hospital São Lucas da PUCRS, agradeço muito por vocês terem me ajudado e me acolhido durante todo o período de coleta das amostras. Também agradeço aos **voluntários** que aceitaram participar do estudo.

Aos meus **amigos**, tanto os de longa data como os que pude conhecer em Toronto, pelo apoio, incentivo, e pelas várias horas de conversa no skype.

Muito obrigada!

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida”.

**Sócrates**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O tabagismo é a maior causa de morte e de doenças preveníveis. A grande variabilidade fenotípica do tabagista deve-se à diversidade dos estímulos ambientais, hábitos e condições pessoais, como eventuais doenças psiquiátricas e aos polimorfismos genéticos. O tabagismo está relacionado com depressão, mas a direção desta relação não está clara. Para a identificação de *loci* que possam aumentar o risco para o tabagismo, muitos estudos de associação genômica ampla vêm sendo realizados para acessar as variáveis relacionadas ao tabagismo. Numerosos SNPs têm sido identificados, mas somente poucos destes foram replicados em estudos independentes.

**OBJETIVO:** Verificar se há associação entre tabagismo e sintomas depressivos, bem como replicar os polimorfismos genéticos relacionados com o tabagismo, previamente descritos, em uma população brasileira.

**MÉTODOS:** Dois estudos, transversal e caso-controle, foram realizados no Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, em duas amostras constituídas de 1021 e 531 indivíduos, não relacionados, doadores de sangue. Os voluntários completaram questionário padrão com variáveis demográficas, relacionadas ao tabagismo e a sintomas depressivos (somente no primeiro estudo). Vinte e um SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) escolhidos foram genotipados usando a plataforma Sequenom MassARRAY iPLEX e os dados analisados pelos programas SPSS e Plink na University of Toronto, Canadá. O nível de significância foi de 0.05.

**RESULTADOS:** Verificou-se associação entre tabagistas atuais e sintomas depressivos e que ex-fumantes têm BDI (*Beck Depression Inventory*) menor que fumantes atuais ( $P < 0.001$ ). Todos os SNPs, tanto em casos como em controles, estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg. Diferenças significativas entre fumantes e não fumantes foram detectadas nos SNPs rs10836358 ( $P = 0.047$ ) no gene *SLC1A2* e rs2268983 ( $P = 0.033$ ) no gene *ACTN1*.

**CONCLUSÃO:** Ex-fumantes têm BDI menor que fumantes atuais. Os SNPs estudados fornecem a primeira confirmação da associação dos polimorfismos rs10836358 e rs2268983 e tabagismo, sugerindo que estes dois genes podem ser relevantes clínica e fisiologicamente.

**Palavras-chave:** Tabagismo. Sintomas depressivos. Polimorfismos genéticos.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Tobacco use is the most preventable cause of death and disease. The wide phenotypic variability of smokers is due to environmental diversity, personal habits and conditions, as eventual psychiatry disorders and genetic polymorphisms. Smoking is related with depression, but the direction of this relation is unclear. To identify *loci* that increase the risk for smoking behavior, many studies of genome wide association have been performed to access smoking variables. Numerous SNPs have been identified, but only a few of these were replicated in independent studies.

**OBJECTIVE:** Verify if there is an association between smoking and depressive symptoms, and also replicate genetics polymorphisms that were previously associated with smoking, in prior studies, in a Brazilian population.

**METHODS:** Two studies, cross-sectional and case-control, were performed Hospital Sao Lucas PUCRS, at Porto Alegre, in two samples with 1021 and 531 subjects, unrelated subjects and blood donors. The volunteers completed a standardized self-report questionnaire including demographic, smoking and depressive symptoms variables (only in the first study). Twenty-one chosen SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) were genotyped using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform and the data were analyzed by SPSS and Plink software at University of Toronto, Canada. The significance level was 0.05.

**RESULTS:** It was verified an association between current smokers and depressive symptoms and that former smokers had lower BDI (*Beck Depression Inventory*) scores compared with current smokers ( $P < 0.001$ ). All SNPs in both cases and controls were in Hardy Weinberg equilibrium. Significant differences between smokers and non-smokers were detected only for SNPs rs10836358 ( $P = 0.047$ ) at *SLC1A2* and rs2268983 ( $P = 0.033$ ) in *ACTN1* gene.

**CONCLUSION:** Former smokers had lower BDI scores compared with current smokers. The studied SNPs provide the first confirmation of the association between rs10836358 and rs2268983, suggesting that these two genes may be physiologically and clinically relevant to smoking behavior.

**Keywords:** Smoking behavior. Depressive symptoms. Genetic polymorphisms.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Prevalência de fumantes segundo estudo *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic*.....18

**Tabela 2** Percentual de adultos fumantes, por sexo, segundo as capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal segundo estudo VIGITEL.....20

**Tabela 3** Estudos de associação relacionando genética e tabagismo.....36



## LISTA DE SIGLAS

|           |   |
|-----------|---|
| BDI       | <i>Beck Depression Inventory</i>  |
| CDC       | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>                                     |
| CPHA      | <i>Canadian Public Health Association</i>   |
| EUA       | Estados Unidos da América   |
| FTND      | <i>Fagerström Test for Nicotine Dependence</i>  |
| GATS      | <i>Global Adult Tobacco Survey</i>  |
| GHPSS     | <i>Global Health Professions Student Survey</i>                                       |
| GSPS      | <i>Global School Personnel Survey</i>   |
| GTSS      | <i>Global Tobacco Surveillance System</i>   |
| GYTS      | <i>Global Youth Tobacco Survey</i>  |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometer</i> |
| NHIS-CCES | <i>National Health Interview Survey-Cancer Control and Epidemiology Supplements</i>   |
| OMS       | Organização Mundial de Saúde  |
| TAG       | <i>The Tobacco and Genetics Consortium</i>  |
| TFI       | <i>Tobacco Free Initiative</i>  |
| WHO       | <i>World Health Organization</i>  |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| 5-HT               | Gene da serotonina  |
| 5-HTT              | Gene transportador da serotonina  |
| ACTN1              | <i>Actinin, alpha 1 gene</i>  |
| ANKK1              | <i>Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 gene</i>               |
| BDNF               | <i>Neurotrophic brain-derived factor gene</i>                           |
| CABLES1            | <i>Cdk5 and Abl enzyme substrate 1 gene</i>                             |
| CAMKK1             | <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha gene</i> |
| CDH23              | <i>Cadherin-related 23 gene</i>   |
| CHRNA5, B3, A3, A4 | Genes receptores nicotínicos da acetilcolina                            |
| COMT               | Gene da catecol-orto-metiltransferase                                   |
| CYP                | Enzima citocromo P450   |
| DA                 | Dopamina  |
| DBH                | <i>Dopamine beta-hydroxylase gene</i>                                   |
| DNA                | Ácido desoxirribonucléico   |
| DPOC               | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica                                      |
| DRD1-5             | Genes receptores de dopamina  |
| DZ                 | Dizigótico  |
| GRB14              | <i>Growth factor receptor-bound protein 14 gene</i>                     |
| GRIM2B             | <i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B gene</i>     |
| GRM6               | <i>Glutamate receptor, metabotropic 6 gene</i>                          |
| GRM8               | <i>Glutamate receptor, metabotropic 8 gene</i>                          |
| GWAS               | <i>Genome-wide association study</i>                                    |
| HTR2A              | Gene receptor da serotonina 2A  |
| HTR5A              | <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A gene</i>                 |
| LD                 | <i>Linkage Disequilibrium</i>   |
| LUZP2              | <i>Leucine zipper protein 2 gene</i>                                    |
| MAO                | Gene da monoamina oxidase   |
| MAO-A              | Gene da monoamina oxidase - A   |

|        |   |
|--------|---|
| MAO-B  | Gene da monoamina oxidase - B   |
| MICAL2 | <i>Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2 gene</i>    |
| MSRA   | <i>Methionine sulfoxide reductase A gene</i>  |
| MZ     | Monozigótico  |
| nAChRs | Receptor nicotínico da acetilcolina   |
| NR3C2  | <i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 gene</i>                               |
| RNA    | Ácido ribonucleico  |
| SAP    | <i>Shrimp alkaline phosphatase</i>  |
| SLC1A2 | <i>Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2 gene</i> |
| SNP    | <i>Single nucleotide polymorphism</i>   |
| TPH1   | Enzima triptofano-hidrolilase-1   |
| TRIM9  | <i>Tripartite motif-containing 9 gene</i>   |
| USH2A  | <i>Usher syndrome gene</i>  |
| VNTR   | <i>Variable Number Tandem Repeat</i>  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| $\mu\text{l}$      | Microlitro          |
| $\mu\text{M}$      | Micromolar          |
| dl                 | Decilitro           |
| M                  | Molar               |
| mg                 | Miligramas          |
| ml                 | Mililitro           |
| mM                 | Milimolar           |
| Ng                 | Nanograma           |
| nM                 | Nanomolar           |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius       |
| rpm                | Rotações por minuto |
| U                  | Unidade             |
| $\alpha$           | Alfa                |
| $\beta$            | Beta                |

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>16</b> |
| 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO TABAGISMO.....   | 16        |
| 1.1.1 Prevalência do tabagismo no mundo.....                                | 17        |
| 1.1.2 Prevalência do tabagismo no Brasil.....                               | 19        |
| 1.2 TABAGISMO E DEPRESSÃO.....  | 22        |
| 1.3 DETERMINANTES GENÉTICOS DO TABAGISMO.....                               | 23        |
| 1.3.1 Estudos de gêmeos.....  | 24        |
| 1.3.2 Estudos em animais de laboratório.....                                | 26        |
| 1.3.3 Estudo de genes que eventualmente possam influenciar o tabagismo ...  | 27        |
| 1.3.3.1 Genes envolvidos no metabolismo da nicotina.....                    | 27        |
| 1.3.3.2 Genes Dopaminérgicos.....   | 29        |
| 1.3.3.3 Genes Serotonérgicos.....   | 31        |
| 1.3.3.4 Genes Receptores Nicotínicos da Acetilcolina.....                   | 32        |
| 1.3.4 Análise de ligação e associação da genética em relação ao tabagismo . | 33        |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3 PACIENTES E MÉTODOS – ARTIGO 1 .....</b>                               | <b>40</b> |
| 3.1 DELINEAMENTO .....  | 40        |
| 3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....  | 40        |
| 3.3 PERÍODO DA COLETA DOS DADOS .....                                       | 40        |
| 3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....                                   | 40        |
| 3.5 ENTREVISTA .....  | 41        |
| 3.5.1 Variáveis demográficas.....   | 41        |
| 3.5.2 Variáveis relacionadas ao tabagismo .....                             | 41        |
| 3.5.2.1 <i>Status</i> tabágico.....   | 42        |
| 3.5.2.2 Teste de Fagerström (FTDN) .....                                    | 42        |
| 3.5.3 Sintomas depressivos.....   | 42        |
| 3.5.3.1 Inventário de Depressão de Beck (BDI) .....                         | 43        |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 43        |
| 3.7 ÉTICA.....  | 43        |
| <b>4 PACIENTES E MÉTODOS – ARTIGO 2 .....</b>                               | <b>47</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 4.1 DELINEAMENTO .....   | 47         |
| 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....                                       | 47         |
| 4.3 PERÍODO DA COLETA DOS DADOS .....                              | 47         |
| 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....                         | 48         |
| 4.5 ENTREVISTA .....   | 48         |
| 4.5.1 Variáveis demográficas.....                                  | 48         |
| 4.5.2 Variáveis relacionadas ao tabagismo .....                    | 49         |
| 4.5.2.1 <i>Status</i> tabágico.....                                | 49         |
| 4.5.2.2 Teste de Fagerström (FTDN) .....                           | 49         |
| 4.6 ANÁLISE LABORATORIAL .....                                     | 50         |
| 4.6.1 Extração do DNA .....  | 50         |
| 4.6.1.1 Lise de hemácias .....                                     | 51         |
| 4.6.1.2 Extração de DNA com Precipitação em Sal .....              | 51         |
| 4.6.2 Genotipagem MassARRAY iPLEX - SEQUENOM.....                  | 52         |
| 4.6.2.1 SNPs selecionados para o Estudo .....                      | 52         |
| 4.6.2.2 Isolamento e quantificação do DNA .....                    | 58         |
| 4.6.2.3 Amplificação do DNA para genotipagem.....                  | 58         |
| 4.6.2.4 Neutralização de dNTPs não incorporados (reação SAP) ..... | 59         |
| 4.6.2.5 Criação da reação iPLEX (reação de extensão) .....         | 60         |
| 4.6.2.6 SpectroCHIP Array.....                                     | 61         |
| 4.6.2.7 Análise dos dados.....                                     | 61         |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                       | 62         |
| 4.8 ÉTICA.....   | 62         |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>81</b>  |
| <b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                   | <b>83</b>  |
| <b>ANEXO A.....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>ANEXO B.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>ANEXO C.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>ANEXO D.....</b>  | <b>101</b> |
| <b>ANEXO E.....</b>  | <b>102</b> |
| <b>ANEXO F.....</b>  | <b>103</b> |

**ANEXO G ..... 106**  
**ANEXO H..... 107**  
**ANEXO I..... 108**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO TABAGISMO

O tabagismo é um dos mais importantes problemas de saúde pública, característico apenas da espécie humana. Apesar dos mais de 50 anos passados desde o primeiro documento(1) sobre os prejuízos do fumo à saúde, o mesmo persiste como uma das principais causas preveníveis de morte no mundo. Aproximadamente 5,4 milhões de pessoas morrem a cada ano devido a doenças relacionadas ao tabagismo e o esperado é que em 2030 esse número ultrapasse os 8 milhões ao ano, sendo metade delas em indivíduos em idade produtiva(2).

No início do século 20, o tabagismo estava limitado ao sexo masculino e a adultos nos Estados Unidos e no oeste da Europa, e era visto como um estilo de vida. Doenças, como o câncer de pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) eram raras e relatos científicos que associassem o tabagismo a doenças e morte eram praticamente inexistentes(3). Atualmente, após vários estudos comprobatórios de que esta associação é verdadeira(4;5), campanhas anti-tabagismo têm sido amplamente difundidas no mundo inteiro como forma de combate à adição. No entanto, ainda existem dificuldades para a cessação.

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS-WHO) juntamente com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (no inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) e a Associação Pública de Saúde Canadense (no inglês, *Canadian Public Health Association* - CPHA) iniciaram a pesquisa *Global Tobacco Surveillance System* (GTSS) no intuito de auxiliar os países a estabelecerem medidas de controle do tabagismo e programas de monitoramento(6). Este levantamento inclui dados das pesquisas: *Global Youth Tobacco Survey* (GYTS) realizado com adolescentes; o *Global School Personnel Survey* (GSPS) realizado com funcionários de escolas, o *Global Health Professions Student Survey* (GHPSS) realizado com estudantes do terceiro ano das faculdades de Odontologia, Medicina, Enfermagem e Farmácia; e por fim o *Global Adult Tobacco Survey* (GATS) realizado com adultos(7).



O GATS foi lançado em fevereiro de 2007 e é uma pesquisa que segue um modelo global para o monitoramento sistemático do uso de tabaco (fumado ou não fumado) e para o acompanhamento de indicadores-chave de controle do tabaco (GTSS). Os resultados desta pesquisa poderão auxiliar os países a formularem e implementarem efetivas intervenções para o controle do tabagismo, além da comparação dos resultados entre os países participantes(8). Inicialmente, farão parte do estudo GATS 16 países em desenvolvimento, nos quais mais da metade da população de fumantes do mundo se encontra. O Brasil está dentre eles assim como: Bangladesh, China, Egito, Índia, Indonésia, México, Paquistão, Filipinas, Polônia, Rússia, Tailândia, Turquia, Ucrânia, Uruguai e Vietnã.

### **1.1.1 Prevalência do tabagismo no mundo**

Cerca de 1 bilhão e 300 milhões de pessoas no mundo são fumantes(9), sendo os homens em maior porcentagem, mas as estatísticas revelam o aumento do tabagismo entre as mulheres. Dados fornecidos pela OMS através do *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic* mostram a prevalência do tabagismo nos países que representam mais de 85% dos fumantes no mundo(10). Este estudo publicado em 2009 faz parte de uma série de relatórios que compõem a *Tobacco Free Initiative* (TFI) que tem como objetivo acompanhar a situação do tabagismo no mundo e o impacto das intervenções implementadas contra o mesmo.

Como se pode verificar na Tabela 1, o país onde há maior prevalência de fumantes adultos é a Ucrânia (41,2%) e o Irã o país com menor prevalência (14,2%). Em todos os países a prevalência de adultos fumantes no gênero masculino foi maior que no gênero feminino. A Ucrânia é o país com a maior prevalência de fumantes do gênero masculino (66,8%) e a França é o país que possui a maior prevalência de fumantes no gênero feminino (26,5%). Nos jovens, a maior prevalência de fumantes foi encontrada no México (28,6%) e a menor prevalência encontrada no Vietnã (3,8%).

**Tabela 1** Prevalência de fumantes segundo estudo *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic*

| Continentes - País          | Prevalência de fumantes (%) |        |          |        |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|----------|--------|
|                             | Adultos                     | Homens | Mulheres | Jovens |
| <b>África</b>               |                             |        |          |        |
| África do Sul               | -                           | 35,1   | 10,2     | 24     |
| Egito                       | 29,9                        | 59,3   | 2,7      | 12,6   |
| <b>Europa</b>               |                             |        |          |        |
| Alemanha                    | 27,2                        | 32,2   | 22,4     | -      |
| Espanha                     | 26                          | 32     | 22       | -      |
| França                      | 29,9                        | 33,3   | 26,5     | -      |
| Itália                      | 30,7                        | 35,2   | 26,2     | -      |
| Reino Unido                 | 21                          | 22     | 20       | -      |
| Polônia                     | 29                          | 34     | 23       | 19,5   |
| Turquia                     | 33,4                        | 50,6   | 16,6     | 8,4    |
| Ucrânia                     | 41,2                        | 66,8   | 19,9     | 26     |
| <b>Ásia - Oriente Médio</b> |                             |        |          |        |
| Bangladesh                  | 36,8                        | 48,6   | 25,4     | 6,9    |
| Coréia do sul               | 29,1                        | 52,8   | 5,8      | 13     |
| China                       | 31,4                        | 57,4   | 2,6      | 5,5    |
| Filipinas                   | 34,7                        | 57,5   | 12,3     | 17,5   |
| Índia                       | -                           | 57     | 10,8     | 13,7   |
| Irã                         | 14,2                        | 24,1   | 4,3      | 26,6   |
| Japão                       | 23,8                        | 39,9   | 10       | -      |
| Mianmar                     | 30,9                        | 48,9   | 13,7     | 15,3   |
| Paquistão                   | 19,1                        | 32,4   | 5,7      | 10,4   |
| Rússia                      | -                           | 60,4   | 15,5     | 27,3   |
| Tailândia                   | 18,5                        | 36,6   | 1,6      | 15,7   |
| Vietnã                      | 24,8                        | 49,4   | 2,3      | 3,8    |
| <b>Américas</b>             |                             |        |          |        |
| Colômbia                    | 18,9                        | 26,8   | 11,3     | 27,6   |
| EUA                         | 19,8                        | 22,3   | 17,4     | 17     |
| México                      | 18,9                        | 30,4   | 9,5      | 28,6   |

Cerca 1 bilhão de homens fumam no mundo. Nos países desenvolvidos, em torno de 35% dos homens são fumantes e nos países em desenvolvimento a prevalência de tabagistas no gênero masculino é de 50% (11). No gênero feminino, estima-se que cerca de 250 milhões de mulheres no mundo sejam fumantes. Nos países desenvolvidos, em torno de 22% das mulheres são fumantes e nos países em desenvolvimento a prevalência de tabagistas no gênero feminino é de 9%(12).

Sobre os jovens, cerca de 100 mil começam a fumar a cada dia no mundo e 80% deles vivem em países em desenvolvimento. Segundo dados do GYTS, os meninos fumam mais que as meninas, mas em quase 60% dos países incluídos não há diferença estatisticamente significativa na taxa de fumantes entre os gêneros(13). E, em 14% dos países mais meninas do que meninos são fumantes(14).

### **1.1.2 Prevalência do tabagismo no Brasil**

O estudo denominado Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL)(15) tem a função de atualizar a frequência, distribuição e a evolução anual de indicadores determinantes das Doenças Crônicas Não Transmissíveis, como o tabagismo. Segundo último levantamento em 2010 feito em 26 cidades e o Distrito Federal, a frequência de fumantes foi de 15,1%, sendo maior no sexo masculino (17,9%) do que no sexo feminino (12,7%).

Entre homens, a frequência de fumantes se mostrou relativamente estável dos 25 aos 64 anos de idade, declinando intensamente entre aqueles com idade inferior a 25 (12,7%) ou superior a 65 anos de idade (10,6%). Entre mulheres, a frequência de fumantes tendeu a aumentar com a idade até os 54 anos (de 12,4% na faixa etária 18-24 anos para 16,4% na faixa etária 45 a 54 anos) e a declinar nas faixas etárias subsequentes, chegando a 6,5% entre aquelas com 65 ou mais anos de idade. A frequência do hábito de fumar foi particularmente alta entre homens e mulheres com até oito anos de escolaridade (22,3% e 15,5%, respectivamente), excedendo em quase duas vezes a mesma frequência observada entre indivíduos com 12 ou mais anos de escolaridade.

A frequência de adultos que fumam variou entre 8,3% em Salvador e 20% em Rio Branco. As maiores frequências de fumantes foram encontradas, entre homens, em São Paulo (22,8%), Campo Grande (22,2%) e Porto Velho (21%) e, entre mulheres, em Rio Branco (19,6%), Porto Alegre (18,6%) e São Paulo (16,8%). As menores frequências de fumantes no sexo masculino ocorreram em Salvador

(9,6%), Aracaju (13%) e Rio de Janeiro (13,4%) e, no sexo feminino, em São Luis (5,6%), Macapá (6,9%) e Manaus (7,1%).

**Tabela 2** Percentual de adultos fumantes, por sexo, segundo as capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal segundo estudo VIGITEL.

| <b>Capitais e DF</b>    | <b>Prevalência de fumantes (%)</b> |             |             |
|-------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|
|                         | Total                              | Homens      | Mulheres    |
| <b>Norte</b>            |                                    |             |             |
| Belém                   | 15,2                               | 20,6        | 10,4        |
| Boa Vista               | 16,3                               | 19,4        | 13,2        |
| Macapá                  | 12,2                               | 17,7        | 6,9         |
| Manaus                  | 11,8                               | 17          | 7,1         |
| Palmas                  | 14,8                               | 18,6        | 10,9        |
| Porto Velho             | 16,1                               | 21          | 11,3        |
| Rio Branco              | 20                                 | 20,5        | 19,6        |
| <b>Nordeste</b>         |                                    |             |             |
| Aracaju                 | 10,6                               | 13          | 8,6         |
| Fortaleza               | 10,9                               | 13,5        | 8,8         |
| João Pessoa             | 12,9                               | 17,7        | 9           |
| Maceió                  | 12,3                               | 14,4        | 10,5        |
| Natal                   | 13,4                               | 18          | 9,5         |
| Recife                  | 13,8                               | 18,9        | 9,8         |
| Salvador                | 8,3                                | 9,6         | 7,2         |
| São Luís                | 9,5                                | 14,4        | 5,6         |
| Teresina                | 13,3                               | 17,2        | 10,1        |
| <b>Centro-oeste</b>     |                                    |             |             |
| Campo Grande            | 15,9                               | 22,2        | 10,1        |
| Cuiabá                  | 15                                 | 18,2        | 12          |
| Goiânia                 | 14,6                               | 19,7        | 10,1        |
| <b>Sudeste</b>          |                                    |             |             |
| Belo Horizonte          | 17                                 | 19,5        | 14,8        |
| Rio de Janeiro          | 13,3                               | 13,4        | 13,3        |
| São Paulo               | 19,5                               | 22,8        | 16,8        |
| Vitória                 | 12,7                               | 16,3        | 9,6         |
| <b>Sul</b>              |                                    |             |             |
| Curitiba                | 17                                 | 18,9        | 15,4        |
| Florianópolis           | 17,4                               | 18,4        | 16,4        |
| Porto Alegre            | 19,5                               | 20,5        | 18,6        |
| <b>Distrito Federal</b> | <b>13,9</b>                        | <b>15,3</b> | <b>12,7</b> |

A prevalência do tabagismo é maior nas capitais brasileiras de regiões mais industrializadas, para ambos os sexos e são inferiores às relatadas em inquéritos brasileiros anteriores. Os homens ainda apresentam maior prevalência do tabagismo do que as mulheres em todas as cidades pesquisadas. A razão de prevalências por sexo (homem/mulher), entretanto, é menor nas regiões Sudeste e Sul, possivelmente apontando para um aumento de consumo de tabaco no grupo feminino em regiões mais desenvolvidas.

A prevalência de fumantes é maior nos grupos populacionais com menor escolaridade (menos de 8 anos de estudo). Esses dados sugerem que, apesar de ter ocorrido expressiva redução do consumo de tabaco no Brasil nos últimos anos, as populações de menor escolaridade parecem estar mais vulneráveis do que as populações mais instruídas às estratégias de mercado que favorecem a iniciação e a manutenção do consumo do tabaco(16), o que parece ser uma tendência mundial(17).

A prevalência de tabagismo entre jovens das regiões Sudeste e Sul é maior do que das regiões Norte e Nordeste, mostrando que, nas regiões mais urbanizadas também há um aumento de consumo nas faixas etárias mais jovens.

Apesar dos malefícios do tabagismo à saúde ainda há pessoas que iniciam ou persistem na adição. As pessoas fumam por vários fatores: curiosidade pelo produto, influência da publicidade maciça do cigarro nos meios de comunicação, que têm forte influência no comportamento tanto dos jovens como dos adultos; pais, professores, ídolos e amigos também exercem uma grande influência levando a uma imitação de comportamento do adulto; necessidade de auto-afirmação visto que os jovens iniciam o tabagismo antes dos 19 anos, momento da construção de sua personalidade, facilidade de aquisição da droga pelo baixo preço, problemas psiquiátricos como a depressão e esquizofrenia, e a hereditariedade(18).

Frente a esta grave situação epidemiológica, os estudos estão se dirigindo para a tentativa de entender porque ainda se fuma tanto, quais os motivos que fazem os jovens a se iniciarem no tabagismo entre outros. A vertente genética poderia explicar a grande variabilidade fenotípica. O comportamento tabágico é bastante variado quanto à sensibilização ou tolerância à nicotina, quanto à capacidade orgânica de sua metabolização, ao grau de intensidade da nicotino-dependência, a maior ou menor dificuldade de abandonar seu uso, ao momento mais precoce ou não de início, aos riscos de recaídas, entre muitas outras

peculiaridades(19). Essa grande variabilidade fenotípica deve-se, provavelmente, aos polimorfismos genéticos implicados nesse processo. Condições individuais especiais, como distúrbios emocionais e condicionamentos psicossociais também podem ajudar a esclarecer.

Este trabalho inclui-se em ambas as linhas de investigação, pretendendo estudar as inter-relações do tabagismo e sintomas depressivos e buscando associações genéticas que possam ajudar a explicar estes fenômenos.

## 1.2 TABAGISMO E DEPRESSÃO

Um grande número de estudos vem examinando a relação entre tabagismo e depressão(20-22). O tabagismo e o grau de dependência nicotínica são maiores nos indivíduos com doenças psiquiátricas em relação à população em geral(23). A depressão é um exemplo de situação clínica em que o tabagismo é mais prevalente em relação aos indivíduos que não tem depressão(21). A prevalência do tabagismo em pacientes com depressão varia de 50-60% comparado com 25% na população em geral. A probabilidade de abandono do tabagismo é reduzida em pacientes com transtornos de depressão. Os fumantes com histórico de depressão correm mais riscos de recaídas durante o período de abstinência, em comparação aos fumantes sem o mesmo histórico(24).

Apesar de muitos estudos mostrarem a relação entre tabagismo e depressão, os resultados destas pesquisas não chegaram a conclusões consistentes no que diz respeito à causalidade entre esses dois fatores(25). A posição de que o tabagismo causa depressão está ligada ao conhecimento de que a nicotina afeta os neurotransmissores relacionados direta ou indiretamente com a depressão. O tabagista tem aumentada sua suscetibilidade à depressão como resultado de mudanças neurofisiológicas provocadas pela nicotina. A afirmação de que a depressão causa o tabagismo é baseada na hipótese de que indivíduos depressivos utilizam o cigarro como auto-medicação, na expectativa de amenizar os sintomas da doença com o uso da nicotina.

Outros estudos demonstram que a relação de causalidade entre tabagismo e depressão resulta da influência de fatores confundidores. Em outras palavras, a

razão pela qual existe a relação entre essas duas variáveis é a existência de fatores de risco, como os genéticos e ambientais que ambas têm em comum(22).

Recentemente, a hipótese que vem se revelando a mais provável é a de que o tabagismo causa a depressão. Boden *et al*(21) verificaram uma relação de causa-efeito entre tabagismo e depressão, na qual o tabagismo aumenta o risco de desenvolver sintomas depressivos. Kang *et al*(22), em um estudo longitudinal, também verificaram que o tabagismo causa depressão. Shahab *et al*(20) reportaram evidências, em um estudo transversal, que ex-fumantes se sentiam mais felizes após cessarem o tabagismo.

Portanto, seguindo esta linha de raciocínio de que depressão não causa tabagismo, mas sim o inverso é o mais provável, volta-se a atenção a outros fatores que possam estar influenciando na iniciação do tabagismo, como por exemplo, fatores genéticos que pré-disponham essa adição.

### 1.3 DETERMINANTES GENÉTICOS DO TABAGISMO

A nicotina e outras substâncias contidas no tabaco são as responsáveis pelo desencadeamento da dependência químico-física do tabagista(26). Entretanto, existem fatores associados que estabelecem a dependência e seus graus de intensidade, como as características fisiológicas, orgânicas, psicológicas, genéticas e comportamentais. Portanto, o hábito de fumar constitui um comportamento multifatorial em que os componentes genético e ambiental se complementam. Por isso é difícil explicar por que algumas pessoas se tornam aditas à nicotina, enquanto outras são usuárias ocasionais ou mesmo a evitam(27).

Os fatores genéticos representam importante papel no comportamento individual em relação ao tabagismo, sendo essas influências mediadas, em parte, por diferenças biológicas e nos traços comportamentais, assim como nas respostas às propriedades da nicotina(28). Estas influências genéticas ocorrem no contexto de determinantes psicológicos e sociais, incluindo, entre outros, fatores como a depressão, o gênero e a pressão ao indivíduo através da publicidade ao tabaco(28).

Apesar dos fatores ambientais estarem claramente envolvidos, Hong *et al*(29), em 2002, estimaram que os fatores genéticos poderiam ter uma

responsabilidade superior a 50% (chega aos 84% em alguns trabalhos) na iniciação e dependência tabágicas e, ainda maior, entre 70-86%, na manutenção do hábito e na quantidade de cigarros fumados por dia.

Estudos envolvendo genética e tabagismo tiveram início há mais de 40 anos, mas só recentemente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, é que muitos aspectos começaram a ser desvendados(18). Os estudos que avaliam a contribuição da genética neste contexto incluem:

- Estudos de gêmeos;
- Estudos em animais de laboratório;
- Estudos de genes que possam influenciar o tabagismo:
  - Metabolismo da nicotina
  - Dopaminérgicos
  - Serotonérgicos
  - Receptores nicotínicos da acetilcolina
- Análises de ligação e associação da genética com o tabagismo.

### 1.3.1 Estudos de gêmeos

Estudos de gêmeos investigam se existem determinantes genéticos na causa de doenças, examinando os índices de concordância em determinados traços. Esse tipo de estudo demonstra que, se a proporção de concordância de gêmeos monozigóticos (MZ) para uma determinada característica for maior que a proporção de gêmeos dizigóticos (DZ), é possível que os genes em estudo determinem a doença em questão. Se não houver diferença significativa na concordância é possível que a característica seja influenciada por fatores ambientais(30). Deste modo, pode calcular-se a proporção (índice) da variação fenotípica atribuível à variação genética. Hall *et al*(31) quantificaram essa concordância e compararam a influência ambiental e individual, concluindo que o componente hereditário pode ser responsável por 60 a 70% da dependência nicotínica.



Fisher *et al*(32), em 1958, foram os primeiros a reportar que a taxa de concordância em relação ao tabagismo é maior em gêmeos MZ do que em gêmeos DZ, em uma amostra do gênero masculino de uma população alemã. Resultados similares foram detectados na Grã-Bretanha, Escandinávia, Austrália, Japão e EUA(33-37). Na Escandinávia, foi encontrada associação entre os fumantes adotados e seus irmãos biológicos, e entre mulheres fumantes e suas mães biológicas e não com as adotivas, reforçando o papel da hereditariedade e diminuindo a importância relativa do meio ambiente nesse comportamento(31;38). Foi verificado também que filhos adotados apresentam similaridade de comportamento em relação ao fumo com seus pais biológicos(38).

A confirmação da evidência inicial de que a dependência nicotínica sofria influência genética ocorreu a partir de um estudo transversal realizado com gêmeos que mostrou uma relação entre hereditariedade e tabagismo com média de 53% (variando de 28-84%)(39). A partir deste estudo, outros foram realizados com gêmeos e têm se estabelecido que fatores genéticos contribuem nas diferenças individuais em múltiplos aspectos do tabagismo(40-42).

Já foram descritos fatores hereditários envolvidos na iniciação ao tabagismo e na permanência na adição(40;43). Li *et al*(40) em meta-análise sobre parâmetros genéticos em relação à dependência nicotínica apontaram que a hereditariedade está relacionada em 37% e 55% (para homens e mulheres, respectivamente) na iniciação ao fumo e em 50% e 46% (para homens e mulheres, respectivamente) na permanência na adição. Estes dois fatores também se correlacionam de forma significativa com a quantidade de cigarros fumados por dia e a dependência nicotínica(41;43-45).

Poucos estudos relacionaram a cessação do fumo e hereditariedade. Xian *et al*(46) identificaram que a hereditariedade está envolvida em 54% dos casos de desistência do tratamento, enquanto Pergadia *et al*(47) indicaram que a hereditariedade esteve relacionada entre 23% a 43% com os sintomas de abstinência, principal fator para o abandono de tratamento.

Juntos, os estudos descritos acima demonstram fortemente que a dependência nicotínica é um traço complexo que envolve múltiplos genes e fatores de risco ambientais, assim como interações entre genes ou entre genes e ambiente. Tais estudos, apesar de demonstrarem o papel da genética no tabagismo, não identificaram os genes eventualmente responsáveis por esse comportamento.

### 1.3.2 Estudos em animais de laboratório

Estudos em animais de laboratório permitem examinar a influência biológica de genes específicos relacionados à dependência nicotínica. Deste modo, considera-se que fatores genéticos determinam o número de receptores nicotínicos localizados no cérebro, os quais vão mediar os efeitos comportamentais e fisiológicos da nicotina. Ajudam a verificar que fatores poderão contribuir para a diferente susceptibilidade à dependência nicotínica encontrada entre os fumantes humanos(27;30).

O primeiro modelo animal descrito foi o de uma linhagem de animais homólogos para todos os *loci* genéticos, portanto similares a gêmeos monozigóticos, pois todos os membros da linhagem são geneticamente idênticos entre si. Hatchell *et al*(48) evidenciaram que esses animais diferem em relação aos efeitos comportamentais e fisiológicos da nicotina. Estas diferenças suportam a hipótese de que fatores genéticos possam contribuir para os diferentes fenótipos de dependência nicotínica nos humanos.

Os animais *knock-out*, nos quais um gene específico é inativado ou alterado, adquirem deficiências bioquímicas que podem revelar a função da proteína expressa pelo gene. Picciotto *et al*(49) demonstraram que a subunidade  $\beta$ -2 do receptor nicotínico da acetilcolina (nAChRs) pode mediar a propriedade de reforço da nicotina, enquanto que a subunidade  $\alpha$ -7 foi considerada importante em mediar as ações da nicotina no hipocampo(50).

Outro modelo de engenharia genética é utilizar um segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) de um determinado organismo e introduzir em uma linhagem germinativa de outro produzindo um animal transgênico. Esta técnica permite examinar receptores específicos que podem mediar as propriedades aditivas da nicotina. Nabeshima *et al*(51) verificaram que camundongos transgênicos que super-expressavam a enzima tirosina hidroxilase, controladora da síntese de dopamina (DA), pareciam ser menos sensíveis aos efeitos fisiológicos da nicotina. Entretanto, a manipulação dos genes pode produzir múltiplas mudanças fenotípicas inesperadas, o que limita a validação deste modelo e sua aplicabilidade em humanos.

### 1.3.3 Estudo de genes que eventualmente possam influenciar o tabagismo

Uma variedade de genes candidatos a uma associação com tabagismo vem sendo estudados. A grande maioria destes estudos focou em variações genéticas na rota metabólica da nicotina, nos neurotransmissores (em especial a dopamina), e nos receptores neuronais nicotínicos da acetilcolina(52).

#### 1.3.3.1 Genes envolvidos no metabolismo da nicotina

Os fumantes tendem a ajustar o seu comportamento de modo a manter o nível de nicotina no cérebro. McMorrow *et al*(53) verificaram que as diferentes formas de processamento da nicotina no sistema nervoso central podem influenciar o seu consumo e necessidade de nova exposição. Tyndale *et al*(54) constataram que indivíduos com tolerância aumentada à nicotina, devido à alta capacidade de metabolizar a droga, podem experimentar poucas reações adversas em seu primeiro contato e, portanto, terão uma grande propensão a continuarem fumando. Contrariamente, a baixa capacidade evidenciada em alguns indivíduos faz com que fumem menos e que uma menor proporção se torne nicotino-dependente.

Polimorfismos nos genes responsáveis pelo metabolismo da nicotina podem ser responsáveis pela diversidade entre os indivíduos em relação à tolerância a nicotina. Então, genes que estejam envolvidos no metabolismo da inativação da nicotina podem ser importantes no entendimento da dependência nicotínica(55). No grupo de enzimas citocromo P450 (CYP), em particular na enzima CYP2A6, ocorrem duas variantes do gene, CYP2A6\*2 e CYP2A6\*3, que foram associadas com diminuição da atividade enzimática, levando os indivíduos a serem catalogados como metabolizadores lentos da nicotina. Isto confere uma proteção contra a iniciação tabágica e contra a dependência nicotínica, menor consumo diário de cigarros e maior probabilidade de sucesso na cessação da adição(56).

Tyndale *et al*(57) demonstraram que as variantes CYP2A6\*2 e CYP2A6\*3 são possivelmente protetoras em relação a dependência do tabaco, já que os indivíduos com estas variantes fumavam quantidades significativamente menores de

cigarros por dia e apresentavam aumento na probabilidade de parar de fumar quando comparados com indivíduos com a variante CYP2A6\*1. Carter *et al*(56) realizaram uma meta-análise com 11 estudos que anteriormente relataram o envolvimento de CYP2A6 em fumantes e não fumantes. A análise, com 5628 indivíduos, mostrou que não há associação entre o gene CYP2A6 com *status* tabágico ou com consumo de cigarros. Xu *et al*(58) descreve 13 variações genéticas na enzima CYP2A6\*1-11\* que resultam na inativação, aumento ou decréscimo na atividade desta enzima contribuindo para os inúmeros fenótipos encontrados nos tabagistas. Mwenifumbo *et al*(59) reportaram que a variante CYP2A6\*1B está associada com a alta capacidade de metabolizar a nicotina *in vivo*. Apesar dos dados controversos, a relação deste gene com o tabagismo ainda é promissora devido já estar demonstrado a relação direta entre o fenótipo e o metabolismo na nicotina.

Outra enzima P450, a CYP2D6, também envolvida na oxidação da nicotina em cotinina, gerou resultados controversos em relação à dependência tabágica(60). Os indivíduos homocigóticos para as variantes CYP2D6\*3, \*4 e \*5 são chamados também *metabolizadores lentos*; aqueles que são portadores de uma ou duas cópias dos genes funcionais CYP2D6\*1 ou \*2 são *metabolizadores rápidos*, e aqueles que são portadores de três ou mais cópias são chamados *metabolizadores ultra-rápidos*(30). Saarikosky *et al*(61) verificaram que nos fumantes a prevalência dos *metabolizadores ultra-rápidos* era quatro vezes maior do que a dos não fumantes, e duas vezes maior do que a dos fumantes com hábitos tabágicos variáveis. Este resultado revela que a atividade aumentada da enzima CYP2D6 pode contribuir na probabilidade de se tornar adito ao tabagismo.

A enzima CYP2B6 é a enzima primária envolvida no metabolismo da bupropiona, portanto, variações deste genótipo poderão ser preditivas no sucesso da cessação tabágica utilizando-se este fármaco. Lee *et al*(62) verificaram que os fumantes que possuíam a variante CYP2B6\*6 no seu genótipo foram os que obtiveram melhores resultados em relação a cessação do tabagismo quando tratados com bupropiona em relação ao placebo.

Tem-se contestado o resultado destes estudos(60;63;64) que defendem que os polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo e depleção da nicotina sanguínea sejam determinantes no comportamento tabágico individual porque se utilizam métodos de fenotipagem mal validados ou porque se determina unicamente

a nicotina e/ou a cotinina nos fluidos humanos e não outros metabólitos relevantes que poderiam ter maior relação com os genes estudados.

### 1.3.3.2 Genes Dopaminérgicos

O sistema dopaminérgico tem recebido especial atenção dos pesquisadores devido a sua participação nos comportamentos aditivos(30). Os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (especialmente no núcleo *accumbens*) têm importância fundamental, pois estão envolvidos nos processos de reforço e recompensa envolvidos no processo da adição.

No tabagismo, as propriedades compensatórias da nicotina já estão bem descritas(48;65;66). A nicotina aumenta a neurotransmissão dopaminérgica no núcleo *accumbens* de animais e a destruição do sistema mesolímbico atenua os efeitos compensatórios quando administrada nicotina intravenosa (67). A nicotina atua nos receptores nicotínicos da acetilcolina e aumenta a neurotransmissão dopaminérgica ao aumentar a liberação sináptica de dopamina, o principal mediador do mecanismo de recompensa relacionado com a dependência a drogas nos humanos(27;68).

O gene da catecol-orto-metiltransferase (COMT) codifica uma enzima que degrada dopamina e, portanto, é um gene candidato a estar envolvido com a dependência nicotínica. O polimorfismo Val108/158Met (rs4680) mostrou afetar significativamente a quantidade de proteína e atividade da enzima(69). Os indivíduos com o genótipo Val/Val têm a atividade da enzima aumentada em até quatro vezes comparado com os indivíduos de genótipo Met/Met(70).

Beuten *et al*(71) verificaram que há associação entre o polimorfismo rs4680 e a dependência nicotínica em ambos os gêneros e em europeus e africanos, concluindo que a menor atividade da COMT parece ser um fator protetor contra o *status* fumante e dependência nicotínica. Em 2008, Shiels *et al*(72) não verificaram associação do mesmo polimorfismo descrito acima com a iniciação ao fumo ou mesmo na permanência na adição. Recentemente, Munafò *et al*(73) verificaram uma modesta associação entre o polimorfismo rs4680 e a quantidade de cigarros fumados por dia em gestantes. Apesar dos dados conflitantes, o gene da COMT se

mantém como gene candidato a estar associado ao tabagismo e aguarda maiores investigações.

O gene da monoamina oxidase (MAO) codifica uma enzima que também degrada dopamina. Existem dois tipos, a MAO-A, que se caracteriza por ter preferência pelo substrato 5-hidroxitriptamina (serotonina); e MAO-B que metaboliza preferencialmente o substrato feniletilamina(74). Atividades anormais de MAO-A tem papel importante em doenças psiquiátricas como depressão. Já anormalidades na MAO-B estão relacionadas com as doenças de Parkinson e Alzheimer(75). Em relação ao tabagismo, sabe-se que o cigarro é uma fonte de agentes químicos que atuam como potentes inibidores de ambas as enzimas(74;76). Polimorfismos nas enzimas MAO-A e MAO-B também estão relacionados com o consumo de cigarro, mas os resultados são conflitantes em relação a sua associação com *status* tabágico. Ito *et al*(77) verificaram que homens com o haplótipo 3 repetições VNTR/644G começam a fumar mais tarde que homens com haplótipo diferente. Os que possuem alelo com 4 repetições tiveram aumento significativo na dependência tabágica. Jin *et al*(78) verificaram a associação do genótipo 1406T/O ou 3 repetições na região VNTR com o aumento do risco de se tornar adicto ao tabagismo.

O gene transportador de dopamina (SLC6A3) codifica uma proteína que regula o nível de dopamina na fenda sináptica e tem sido estudada como um possível gene candidato a estar relacionado com o tabagismo(79). Sieminska *et al*(80) demonstraram que a variável SLC6A3-9 é mais frequente em não fumantes, e que fumantes possuidores deste genótipo começaram a fumar mais tardiamente e que ao cessar passaram um período maior de abstinência, comparado com indivíduos com a outra variável.

A dopamina possui 5 subtipos de receptores (D1-D5) codificados pelos genes DRD1-5. O polimorfismo DRD2-TaqIA que é uma variante genética associada aos níveis de expressão de dopamina no cérebro tem sido relacionada com vários aspectos do tabagismo. Zuo *et al*(81) verificaram que mulheres com pelo menos um alelo A1 do polimorfismo TaqIA reportaram fumar por efeitos estimulatórios ou para diminuir sentimentos ou emoções negativas quando comparados com mulheres que não possuíam o alelo A1. No gênero masculino este dado não foi significativo.

David e Munafò(82) identificaram que a variante denominada alelo longo, do gene DRD4, está associada com maior risco de ser fumante, iniciar o tabagismo

mais cedo e ter mais dificuldade de cessar a adição em relação à variante alelo curto. Em outro estudo o mesmo alelo longo foi relacionado com tabagismo e depressão(83). Já os genes DRD1, DRD3 e DRD5 têm relação modesta com o comportamento tabágico(30).

A maioria dos estudos que relacionam genes dopaminérgicos com o tabagismo tem procurado investigar genes que codificam enzimas que degradam dopamina assim como genes transportadores e receptores de dopamina. Entender os mecanismos de atuação da via dopaminérgica em relação ao tabagismo é de fundamental importância já que a dopamina está diretamente relacionada ao mecanismo de reforço e recompensa que substâncias como a nicotina provocam no cérebro.

#### 1.3.3.3 Genes Serotonérgicos

A serotonina (5-HT) modula a liberação da dopamina e vem sendo envolvida nos mecanismos de reforço à ação da nicotina(84). Os genes receptores de serotonina estão divididos em sete grupos (5-HT<sub>1-7</sub>). O subtipo 2 de receptores estão categorizados em três subtipos (A,B e C)(85). O gene receptor de serotonina 2A (HTR2A) possui o polimorfismo T102C (rs6313) que apesar de não causar alteração no aminoácido formado, tem descrito na literatura que o alelo C ocasiona a expressão diferencial do gene ocasionando uma diminuição na síntese desse receptor(86).

do Prado-Lima *et al*(85) verificaram diferenças na distribuição dos genótipos quando compararam fumantes com não fumantes e ex-fumantes sugerindo que o polimorfismo T102C está envolvido com a manutenção da adição e não com a iniciação ao tabagismo. O genótipo CC foi mais frequente em fumantes em relação aos não fumantes e ex-fumantes. Outro polimorfismo neste receptor, o A-1348G (rs6311), afeta a atividade da região promotora do receptor e está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo T102C. Há evidências de que esse polimorfismo esteja associado com diferentes desordens psiquiátricas e possa predispor ao tabagismo(87). Polina *et al*(87) sugeriram a contribuição do HTR2A no tabagismo. Mais precisamente, o polimorfismo A-1438G teve o alelo A mais frequente no grupo

dos fumantes em comparação com o grupo controle. Recentemente, White *et al*(88) verificaram que possuir o genótipo TT do polimorfismo T102C é um fator de risco para o tabagismo, o que difere do estudo do Prado Lima *et al*(85) que verificaram associação do genótipo CC com o tabagismo. Por outro lado, corroboraram o resultado de Polina *et al*(87)(dado o forte desequilíbrio de ligação com A-1438G) ao verificarem associação do genótipo AA e o tabagismo.

O polimorfismo no gene transportador da serotonina 5-HTT atraiu atenções já que ele regula a magnitude e a duração da transmissão da serotonina. Existe um polimorfismo na região promotora denominado 5-HTTLPR (*5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region*) que gera as variantes longa (L) e curta (S)(89). A variante S reduz atividade transcricional do gene o que resulta na diminuição da expressão do 5-HTT e da captação da serotonina(30). Chu *et al*(89) demonstraram associação entre o genótipo L/L e S/L e fumantes do gênero masculino quando comparado aos não fumantes. Em contrapartida, Lerman *et al*(90) verificaram que fumantes homozigotos ou heterozigotos para a variante S eram mais dependentes de nicotina que os homozigotos para a variante L.

A enzima triptofano-hidrolilase-1 (TPH1), envolvida na síntese da serotonina, possui um polimorfismo 779C>A associado com a iniciação ao fumo, sendo que indivíduos com o genótipo Arg/Arg reportaram essa iniciação mais precocemente(91). Os indivíduos AC obtiveram os maiores índices de dependência nicotínica medidos através do FTDN (*Fagerström Test for Nicotine Dependence*) (92).

A nicotina aumenta a liberação de serotonina no sistema nervoso central. Portanto, a investigação dos genes relacionados com a via serotoninérgica são de fundamental importância, pois contribuem para um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na adição do tabagismo.

#### 1.3.3.4 Genes Receptores Nicotínicos da Acetilcolina

Sabe-se que a nicotina desencadeia seus variados efeitos através da sua ligação com os receptores nicotínicos da acetilcolina, assim influenciando a memória, estimulação, atenção, humor, etc. Existem dois grupos de subunidades



descritos:  $\alpha$ 2-10 e  $\beta$ 2-4. Variações no DNA que codificam esses genes podem alterar a estrutura ou quantidade de proteína produzida o que pode modificar o que acontece quando a nicotina se liga a esses receptores(93).

Inicialmente, pesquisas examinaram a influência dos receptores nACh na adição provocada pela nicotina nas subunidades  $\alpha$ 4 e  $\beta$ 2 que são as mais abundantes e estão distribuídas por todo o cérebro. Atualmente, muitos genes receptores nACh vem sendo associados com o tabagismo em relação à iniciação ao fumo(94), resposta ao tabagismo durante sua exposição precoce(95), números de cigarros por dia(96), dependência nicotínica(97) e câncer de pulmão(98).

Saccone *et al*(99) reportaram, em um estudo caso-controle com mais de 300 genes candidatos, a associação dos genes dos receptores nicotínicos da acetilcolina, em especial o receptor nicotínico da acetilcolina subunidade  $\alpha$ 5 (CHRNA5) e receptor nicotínico da acetilcolina subunidade  $\beta$ 3 (CHRNB3), com dependência do tabagismo. Weiss *et al*(100) verificaram associação entre o haplótipo CHRNA5-A3-B4 e o aumento do risco de dependência nicotínica nos indivíduos que iniciaram o uso de tabaco antes dos 17 anos. Recentemente, Schwartz *et al*(101) e Li *et al*(102) relacionaram, respectivamente, o mesmo haplótipo com risco de câncer de pulmão e dependência nicotínica em afro-americanos.

Os genes dos receptores nicotínicos da acetilcolina são os mais estudados em relação ao tabagismo já que os efeitos da nicotina são mediados primeiramente por estes receptores. Conseqüentemente, esses receptores se tornaram alvo molecular para o desenho de novos medicamentos para a cessação do tabagismo. A vareniclina, medicamento para a cessação do tabagismo, possui afinidade pelas subunidades  $\alpha$ 4 e  $\beta$ 2 diminuindo os sintomas da abstinência(103).

#### **1.3.4 Análise de ligação e associação da genética em relação ao tabagismo**

Quando polimorfismos no DNA foram descobertos nos anos 80 e 90, começaram os estudos cromossômicos em larga escala em famílias em busca de uma relação entre as doenças e a genética. Estudos epidemiológicos sugeriram uma complexa contribuição genética no tabagismo, envolvendo múltiplos genes

suscetíveis e fatores ambientais. Genes causais ainda não foram identificados, mas *loci* cromossômicos têm sido identificados por estudos de ligação e associação.

Os termos *ligação* e *associação* são comumente utilizados em estudos genéticos. O primeiro refere-se à relação entre um dado *locus* genético e um fenótipo específico, enquanto que o segundo refere-se a uma relação entre um alelo específico de um dado gene e um fenótipo em particular(104).

Estudos de ligação são baseados no princípio de que largos blocos de DNA são herdados inalterados através da meiose, portanto uma marca no DNA pode ser usada como rastreador na transmissão desses blocos dos pais para os descendentes.

Estudos de associação genômica ampla (no inglês, *Genome-wide association study* - GWAS) geralmente usam centenas de marcadores polimórficos no DNA, distribuídos ao longo do genoma, para determinar se alelos específicos herdados dos pais são mais comumente encontrados em descendentes afetados pela doença em relação aos não afetados, assim como se alelos marcados co-segregam a doença entre os familiares. Se certos marcadores mostram esse padrão mais frequentemente do que o esperado, se diz que esse marcador está relacionado ao fenótipo clínico, e por consequência ao gene que o codifica. Esses marcadores podem ser polimorfismos de um nucleotídeo (no inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs) ou microsátélites(52).

Os SNPs são substituições de uma única base nitrogenada que ocorrem em regiões específicas do genoma, com intervalos regulares de 300 a 1000 bases, que estão presentes em pelo menos 1% da população e compreendem cerca de 90% das variações genéticas(105). Ocorrem tanto em regiões não codificadoras como nas codificadoras. Somente uma pequena parcela dos polimorfismos genéticos está em regiões codificadoras e uma parcela ainda menor é responsável por mudanças no aminoácido formado.

Regiões não codificadoras podem ainda assim afetar a regulação do gene, influenciando na estabilidade e conformação do RNA mensageiro, quantidade e qualidade do produto da expressão do gene. Nas regiões codificadoras, podem ser classificados como sinônimos (mutação silenciosa) em que não ocorre alteração no aminoácido formado; e não-sinônimos em que ocorre alteração no aminoácido formado. Então, variações genéticas podem causar doenças por duas vias:

alterando a estrutura da proteína codificada (substituição do aminoácido) ou alterando a expressão do gene(106).

A procura de genes suscetíveis ao tabagismo começou com estudos de ligação que levaram ao conhecimento de várias regiões do genoma a se tornarem positivamente associadas com a suscetibilidade ao tabagismo. Os resultados dos estudos de ligação sugerem regiões que são importantes *loci* relacionados ao tabagismo.

Li *et al*(107) identificaram, em uma meta-análise, 13 regiões cromossômicas que associam genética e tabagismo em pelo menos 2 amostras independentes. As regiões são nos cromossomos 3–7, 9–11, 17, 20, e 22. Dentre elas, as regiões nos cromossomos 9, 10, 11 e 17 foram as que tiveram valores mais significativos, mas os dados na literatura ainda são controversos devido ao tamanho amostral e as etnias variarem entre os estudos. Os cromossomos 5, 8, 9, 17 e 20 foram associados com dependência nicotínica.(108-110). Os cromossomos 5, 6, 14 e 22 foram associados com a iniciação ao tabagismo (44;111). Os cromossomos 4, 5, 15 e 22 foram associados com o número de cigarros fumados ao dia(96;108;109;112).

Estudos de associação genômica ampla têm sido desenvolvidos e usados para a identificação de *loci* e genes específicos e variantes genômicas que predisponham a fenótipos relacionados ao tabagismo (Tabela 3).

O primeiro estudo GWAS relacionado à dependência nicotínica foi realizado por Bierut *et al*(113) que compararam 1050 tabagistas versus 879 controles (Tabela 3). Apesar de nenhum SNP atingir valores significativos, a mesma amostra foi novamente analisada por Saccone *et al*(99) com o objetivo de analisar 3713 SNPs em 348 genes candidatos. Vários genes de receptores colinérgicos nicotínicos localizados no cromossomo 15 (15p25) foram significativos, mas a associação mais importante em relação à dependência nicotínica foi verificada no polimorfismo rs16969968 que é um SNP não sinônimo do gene CHRNA5. Esta associação vem sendo replicada em outros estudos independentes(114-116). Li *et al*(102) associaram os polimorfismos rs1317286 e rs8040868 no gene CHRNA3 com dependência nicotínica em uma população de afro-americanos.

**Tabela 3** Estudos de associação relacionando genética e tabagismo.

| <b>Pesquisador /Ano</b> | <b>Aspecto do fumo</b> | <b>Gene/SNPs</b>     | <b>Tipo de estudo</b> | <b>Participantes</b>              |
|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Bierut et al 2007       | DN                     | 31960 SNPs           | GWAS                  | Norte-americanos e australianos   |
| Saccone et al 2007      | DN                     | 300 genes; 3317 SNPs | GWAS                  | Norte-americanos e australianos   |
| Uhl et al 2007          | CT                     | 520000 SNPs          | GWAS                  | Europeus e euro-americanos        |
| Uhl et al 2008          | CT                     |                      | GWAS                  | Europeus                          |
| Berretine et al 2008    | QCF-dia                | CHRNA3-A5            | GWAS                  | Europeus                          |
| Thorgeirsson et al 2008 | DN; CP; DAP            | 306.207 SNPs         | GWAS                  | Europeus                          |
| Spitz et al 2008        | DN; CP                 | 315450 SNPs          | GWAS                  | Europeus                          |
| Baker et al 2009        | CT                     | CHRNA5-A3-B4         | Gene association      | Norte-americanos                  |
| Saccone et al 2009      | DN                     | 75 SNPs              | Gene association      | Euro-americanos e afro-americanos |
| Vink et al 2009         | IT; MT                 | 427037 SNPs          | GWAS                  | Holandeses                        |
| Caporaso et al 2009     | QCF-dia                | 518000 SNPs          | GWAS                  | Europeus                          |
| Freathy et al 2009      | CT                     | CHRNA5-A3-B4         | Gene association      | Descendente europeu               |
| Sherva et al 2009       | DN                     | CHRNA5-A3-B4         | Gene association      | Euro e afro-americanos            |
| Furberg et al 2010      | IT; QCF-dia; CT        | 140000 SNPs          | GWAS                  | Europeus                          |
| Thorgeirsson et al 2010 | QCF-dia                | 2500000 SNPs         | GWAS                  | ENGAGE                            |
| Li et al 2010           | IT; QCF-dia; CT        | CHRNA5-A3-B4         | Gene Association      | Descendente asiático              |
| Li et al 2010           | DN                     | CHRNA5-A3-B4         | Gene association      | Euro-americanos e afro-americanos |
| Sorice et al 2011       | QCF-dia                | CHRNA5-A3-B4         | Gene association      | Italianos                         |

Dependência nicotínica: DN; Cessação do tabagismo: CT; Quantidade de cigarros fumados por dia: QCF-dia; Câncer de pulmão: CP; Doença arterial periférica: DAP; Iniciação ao tabagismo: IT; Manutenção do tabagismo: MT.

Furberg *et al*(117) identificam em uma meta-análise realizada com amostras do consórcio tabagismo e genética (no inglês *The Tobacco and Genetics Consortium* - TAG) constituída de 74.053 voluntários de ancestralidade europeia, verificaram a relação em oito *loci* com a iniciação ao tabagismo, sendo o SNP não sinônimo rs6265 do gene do fator neurotrófico cerebral (no inglês *neurotrophic brain-derived factor* – BDNF) no cromossomo 11 o mais significativo. Este gene está

localizado próximo ao gene NTRK2 que anteriormente também foi associado com iniciação ao fumo(118).

Caporaso *et al*(119) uniram amostras de dois estudos, no total de 4.616 voluntários e verificaram associação significativa entre os SNPs rs6437740 do gene BBX localizado no cromossomo 3 e do rs2036527 localizado em uma região entre os genes receptores nicotínicos CHRNA3 e CHRNA5 no cromossomo 15 e a quantidade de cigarros fumados por dia. Furberg *et al*(117) identificaram três *loci* associados com a quantidade de cigarros fumados por dia. A associação mais significativa foi a do SNPs sinônimo rs1051730 na região 15q25 no gene do receptor nicotínico CHRNA3. Thorgeirsson *et al*(120) verificaram associação do mesmo polimorfismo e a quantidade de cigarros fumados por dia além dos polimorfismos rs4105144 (no cromossomo 19) e rs6474412 (no cromossomo 8). Recentemente, Sorice *et al*(121) replicou a associação do polimorfismo rs1051730 em duas populações italianas distintas.

Estudos que associassem genética e cessação do tabagismo também foram gerados(98;113;122;123). Baker *et al*(124) e Freathy *et al*(125) sugerem em seus estudos que o polimorfismo rs16969968 diminui as chances de sucesso na cessação da adição. Outro SNP, rs3025343, localizado perto do gene da dopamina beta-hidroxiase (do inglês *dopamine beta-hydroxylase* – DBH) no cromossomo 9 foi associado com cessação do tabagismo(117).

Como descrito na Tabela 3, é possível verificar que foram descritas associações entre variáveis relacionadas ao tabagismo, como dependência nicotínica, iniciação ao tabagismo, quantidade de cigarros fumados ao dia e cessação do tabagismo. A partir da constatação de uma provável contribuição hereditária para adição tabágica, vários polimorfismos genéticos estão sendo estudados como possíveis responsáveis pelos diferentes fenótipos existentes em relação ao tabagismo. Estudos de associação usando SNPs se tornaram um método para a identificação de fatores genéticos que desencadeiam doenças complexas(126).

Infelizmente, a identificação de genes causadores de doenças é desafiadora primeiramente devido à heterogeneidade fenotípica e a potencial existência de numerosos genes suscetíveis cada um podendo exercer um efeito pequeno que juntos podem interagir um com o outro e com fatores ambientais causando a doença.

Em resumo, o desafio de entender, em termos moleculares, como as variações genéticas conferem suscetibilidade ao tabagismo permanece difícil. Será preciso identificar as verdadeiras variantes de risco em cada gene candidato, e determinar de que modo cada variante altera a função de cada proteína codificada. Por isso, estudos de replicação de polimorfismos genéticos em populações independentes são de fundamental importância para que se comprove de fato a participação do polimorfismo pesquisado com a doença em questão.

A recente descrição completa do genoma humano poderá ajudar a identificar marcadores genéticos que predigam o risco do uso do tabaco e do conseqüente desenvolvimento de dependência nicotínica e, talvez, do surgimento de doenças relacionadas ao seu uso.

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- Verificar se há associação entre tabagismo e sintomas depressivos;
- Replicar os polimorfismos genéticos relacionados com o tabagismo, previamente descritos, em uma população brasileira.

## **3 PACIENTES E MÉTODOS – ARTIGO 1**

### **3.1 DELINEAMENTO**

O estudo proposto foi do tipo transversal.

### **3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

O estudo foi conduzido em uma amostra de 1021 voluntários (131 ex-fumantes, 254 fumantes e 636 não fumantes) de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 65 anos, que frequentaram o Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS. Os voluntários residiam no estado, se dispuseram a ler e assinar a Carta Informativa (ANEXO A) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B), responderam a entrevista e permitiram a utilização dos seus dados para fins de pesquisa.

### **3.3 PERÍODO DA COLETA DOS DADOS**

A coleta dos dados ocorreu entre Outubro de 2004 e Agosto de 2008.

### **3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

Foram incluídos voluntários de ambos os gêneros, caucasianos, alfabetizados, que não estivessem em tratamento para tabagismo (medicamentoso ou não); que preencheram os critérios para doação de sangue (ANEXO C), e



realizaram a mesma, no período de coletas no Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS.

Foram excluídos os indivíduos com outras adições, com comorbidades psiquiátricas, com exceção de depressão. Também foram excluídos os que tiveram contra-indicação para doar sangue, pelos critérios exigidos pelo Banco de Sangue ou se recusaram a participar da pesquisa.

### 3.5 ENTREVISTA

Todos os voluntários foram submetidos à entrevista (após o consentimento) para informarem sobre as características individuais (ANEXO D). As perguntas visavam classificar os indivíduos de acordo com as variáveis demográficas, as relacionadas ao tabagismo (incluindo *status* tabágico e grau de dependência nicotínica) e a sintomas depressivos.

#### 3.5.1 Variáveis demográficas

- Gênero.
- Idade atual (anos completos).
- Escolaridade (ensino fundamental, médio ou superior).
- Trabalho (ativo, aposentado, ou auxílio doença/desemprego).
- Renda familiar (em salários mínimos).
- Etnia (caucasóide).
- Estado civil (com companheiro fixo ou sem companheiro fixo).

#### 3.5.2 Variáveis relacionadas ao tabagismo

- *Status* tabágico (não fumante, ex-fumantes e fumante).
- Idade de início do uso do fumo (em anos).
- Tempo de uso do tabaco (em anos).
- Quantidade de cigarros fumados por dia (número de cigarros/dia).
- Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTDN).

#### 3.5.2.1 *Status* tabágico

Os voluntários foram classificados quanto ao *status* tabágico segundo critérios do *National Health Interview Survey-Cancer Control and Epidemiology Supplements* (NHIS-CCES), vinculado ao CDC(127). Os indivíduos não fumantes foram os que relataram nunca ter fumado ou que fumaram menos do que 100 cigarros ao longo de suas vidas. Os indivíduos fumantes foram os que relataram ter fumado pelo menos 100 cigarros durante suas vidas e que atualmente estavam fumando. Indivíduos ex-fumantes foram os que relataram estar em abstinência há pelo menos seis meses.

#### 3.5.2.2 Teste de Fagerström (FTDN)

Para os voluntários classificados como fumantes foi aplicado o Teste de Fagerström(128) (ANEXO E) que avalia o grau de dependência nicotínica. É um questionário constituído por seis (6) perguntas com alternativas para resposta. Cada alternativa corresponde a uma pontuação. Ao final foi somada a pontuação, que varia de 0 a 10, e uma tabela indica o grau de dependência nicotínica. Esta varia de muito baixo (menor pontuação) a muito alto (maior pontuação).

### **3.5.3 Sintomas depressivos**

### 3.5.3.1 Inventário de Depressão de Beck (BDI)

O Inventário de Depressão de Beck (*Beck Depression Inventory* - BDI)(129) (ANEXO F) consiste em um questionário de auto-relato com 21 itens de múltipla escolha. É um dos instrumentos utilizados para medir a severidade de episódios depressivos. Para cada pergunta existem quatro opções de resposta, numeradas de 0 a 3, sendo que zero é considerado normal e, 3, é o mais severo. A pontuação máxima adquirida é 63. De acordo com essa escala, os escores de 0 a 9 mostram grau mínimo de depressão; de 10 a 16, grau médio; de 17 a 29, grau moderado e de 30 a 63, grau severo. O ponto de corte neste estudo foi 15 pontos ou mais ser indicativo de o indivíduo ter sintomas depressivos(130).

## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados contínuos foram validados usando-se ANOVA e coeficientes de correlação parcial. Variáveis categóricas foram analisadas através do teste Qui-quadrado. Todas as análises foram feitas no software SPSS versão 12 (SPSS Inc, IL, USA). O nível de significância adotado foi de 0.05.

## 3.7 ÉTICA

O estudo foi realizado após a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, com o protocolo de número CEP08/04239, e seguiu as recomendações da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO H e I). Os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



# BJPsych

The British Journal of Psychiatry

## Tobacco smoking and depression: results of a cross-sectional study

Vanessa Argondizo dos Santos, Ana Maria Migott, Claiton Henrique Doto Bau and José Miguel Chatkin

The British Journal of Psychiatry 2010; 197: 413-414  
 Access the most recent version at doi:10.1192/bjp.197.5.413

---

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| References                         | This article cites 10 articles, 5 of which can be accessed free at:<br><a href="http://bjp.rpsych.org/cgi/content/full/197/5/413#References">http://bjp.rpsych.org/cgi/content/full/197/5/413#References</a> |
| Reprints/permissions               | To obtain reprints or permission to reproduce material from this paper, please write to <a href="mailto:permissions@rpsych.ac.uk">permissions@rpsych.ac.uk</a>   |
| You can respond to this article at | <a href="http://bjp.rpsych.org/cgi/eletter-submit/197/5/413">http://bjp.rpsych.org/cgi/eletter-submit/197/5/413</a>  |
| Email alerting service             | Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or <a href="#">click here</a>  |
| Downloaded from                    | <a href="http://bjp.rpsych.org">bjp.rpsych.org</a> on March 13, 2011<br>Published by The Royal College of Psychiatrists  |

---

To subscribe to The British Journal of Psychiatry go to:  
<http://bjp.rpsych.org/subscriptions/>

---

## Correspondence

Edited by Kiriakos Xenitidis and  
Colin Campbell

## Contents

- ▲ Tobacco smoking and depression: results of a cross-sectional study
- ▲ Does medication benefit the long-term psychiatric outcomes of children with ADHD?
- ▲ Erasing trauma memories
- ▲ Early intervention in psychosis

Tobacco smoking and depression:  
results of a cross-sectional study

A recent study by Boden et al<sup>1</sup> concluded that there is a cause-effect relationship between cigarette smoking and depression in which tobacco use increases the risk of symptoms of depression. In a large longitudinal study, Kang & Lee<sup>2</sup> showed that smoking caused depression. Shahab & West<sup>3</sup> reported evidence from a cross-sectional survey that ex-smokers feel happier following cessation.

These results may have very important clinical consequences – if smokers can be reassured that their mood can be improved after smoking cessation, it could motivate patients in their attempts to quit. Our own data are consistent with such findings and with the current literature regarding the relationship between depression and smoking status as well as gender. We performed an investigation focusing on depression symptoms among 1021 unrelated blood donors categorised as former smokers, current smokers and never smokers. The sample distribution was: former smokers,  $n = 131$ ; current smokers,  $n = 254$ ; and never smokers,  $n = 636$ . Former smokers were individuals who had reached 6 months of tobacco abstinence. Using a cross-sectional design, the participants were selected during the period from October 2004 to August 2008. Inclusion criteria were: to be Brazilian or European descent, 18 to 465 years old, male or female and eligible for blood donation. Exclusion criteria included other addictions, current use of any psychopharmacological medication and major psychopathologies, except major depressive disorder. All participants completed a standardised self-report questionnaire that included demographic characteristics and a smoking history. Depression symptoms were evaluated by the Portuguese version of the Beck Depression Inventory (BDI)-4.<sup>4</sup> The BDI scores were analysed as a continuous measure or as a cut-off of 5/5 indicating depressive symptoms.

Level of education was higher among never smokers ( $n = 164$ , 25.9%) compared with current smokers ( $n = 40$ , 15.7%) and former smokers ( $n = 24$ , 18.3%) ( $W = 21.56$ ,  $PS0.001$ ). This suggests that current and former smokers might share a premorbid behavioural profile different from never smokers. More current smokers had a BDI score 5/5 (current smokers,  $n = 38$ , 15.0%; never smokers,  $n = 47$ , 7.4%; former smokers,  $n = 9$ , 6.9%;  $W = 13.43$ ,  $P = 0.001$ ). Average BDI scores were also higher among current smokers (mean 7.4,  $s.d. = 7.8$ ) compared with never smokers (mean 5.2,  $s.d. = 6.5$ ) and former smokers (mean 5.0,  $s.d. = 5.6$ ) even after adjustment for gender, age and years of schooling ( $F = 10.93$ ,  $PS0.001$ ). There were no significant differences between former and never smokers on depression indices. There was no significant interaction between smoking

status and gender – that is, females had higher depression scores than males, regardless of smoking status, pointing to the cross-gender validity of the association. Beck Depression Inventory scores were significantly correlated with Fagerstrom Test for Nicotine Dependence scores ( $r = 0.16$ ,  $P = 0.01$ ) and average daily number of cigarettes smoked ( $r = 0.16$ ,  $P = 0.01$ ). The results of our relatively large sample suggest that depression scores are lower among former smokers, despite the similar profiles in other characteristics such as education and gender across all three groups.

This issue has been raised by other authors. Wu & Anthony<sup>5</sup> verified in a longitudinal study that although smoking increased the risk for depression, antecedent depressed mood was not associated with later cigarette smoking. A review by the National Institute of Mental Health pointed out the danger posed by over-reliance on the self-medication hypothesis. According to the authors, this misconception may have led to a grossly inadequate attention to tobacco-smoking in mental health settings. Munafò et al<sup>6</sup> have suggested a causal relationship between cigarette smoking and depression.

The interpretation of our results should be cautious, since cause-effect relationships cannot be explained in cross-sectional studies, where recall bias is always a possibility. Former smokers may differ from current smokers both in terms of their primary depression and nicotine dependence severity. As Fagerstrom & Furberg<sup>7</sup> pointed out, less dependent smokers may quit more easily and remaining dependent smokers may need more intensive treatment. Another scenario is that previous depressive symptoms might have predisposed some individuals to smoke, and when symptoms faded, they stopped smoking.

Our preliminary results are consistent with these findings, suggesting that former smokers have a better mood than current smokers. If confirmed in future follow-up studies, this evidence will certainly stimulate new approaches for smoking prevention in adolescence and smoking cessation techniques for adults. If smokers can be reassured that their mood may actually improve after smoking cessation, once the withdrawal syndrome has ended, this knowledge could motivate patients in their attempts to quit. We agree with this position and suggest that it is equally valid for both genders.

## Funding

C.H.D.B. received funding from FAPERGS-DECT-PPSUS and CNPQ – Instituto do Milênio and J.M.C. received funding from FAPERGS-PSUS.

1 Boden JA, Ferguson DM, Hornsby LJ. Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *Br J Psychiatry* 2010; **196**: 440–6.

2 Kang S, Lee J. A longitudinal study on the causal association between smoking and depression. *J Prev Med Public Health* 2010; **43**: 123–204.

3 Shahab L, West R. Do ex-smokers report feeling happier following cessation? Evidence from a cross-sectional survey. *Nicotine Tob Res* 2009; **11**: 555–7.

4 Beck AT, Steer RA, Gibbon M. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: twenty-five years of evaluation. *Clin Psychol Rev* 1997; **11**: 71–100.

5 Coleman C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996; **29**: 452–7.

6 Fagerstrom K, Furberg H. A comparison of the Depression Test for Nicotine Dependence and smoking prevalence across countries. *Addiction* 2005; **100**: 541–5.

7 Wu LT, Anthony JC. Tobacco smoking and depressed mood in late childhood and early adolescence. *Am J Public Health* 1992; **82**: 1027–30.

8 Nelson D, Hennen B, Beckham JC, Bolenstein M, Adler LB, Audrain-McGovern J et al. Tobacco use and cessation in psychiatric

disorder. National Institute of Mental Health report. *Nicotine Tob Res* 2005; 10: 1691-713.

9 Munafò MR, Hartman DL, Rende R, Maisto C, Niaura R. Effects of progression to cigarette smoking on depressed mood in adolescents: evidence from the National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Addiction* 2008; 103: 162-71.

10 Munafò MR, Angu R. Cigarette smoking and depression: a question of causation. *BJ Psychiatry* 2010; 196: 423-6.

Vanesia Aguiar da Silva Santos, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica Rio Grande do Sul, Ana Maria Vigotti, School of Medicine, Universidade de Passo Fundo, Caillon Henrique Ochoa Dau, Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, José Miguel Charkin, All (apartment 600), room 314, Jefferson School of Medicine Graduation Office, Pontifícia Universidade Católica Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91510-000, Brazil. Email: jreinh@pucrs.br

doi: 10.1192/bip.1973.4.413

#### Does medication benefit the long-term psychiatric outcomes of children with ADHD?

Langley and colleagues<sup>1</sup> reported 5-year follow-up outcomes of young children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and the maternal and social factors related to the prognosis. The findings provide evidence of high comorbidity of antisocial behaviour associated with ADHD, drawing attention to the long-term outcomes of the disorder. Yet, in my opinion, additional information needs to be clarified regarding the findings.

The authors showed that medication use was not significantly associated with conduct disorder diagnosis or other antisocial behaviours. However, this interesting result was not discussed in detail in the article. What I am interested in is whether medication could reduce the risk of developing psychiatric diseases. Recently, studies have shown that treatment with stimulant drugs for ADHD could reduce the risk for some psychiatric disorders. In a systematic review, Wilens et al<sup>2</sup> reported that medication in childhood was associated with a reduction in the risk for subsequent substance misuse. Biederman et al<sup>3</sup> showed that stimulant treatment of youths with ADHD decreased the risk for depressive and anxiety disorders and disruptive behaviour later in life. Both studies indicate that medication can benefit psychiatric outcomes. In Langley et al's study,<sup>1</sup> most of the participants (63%) received prescribed stimulant drugs, but the psychological outcomes were not optimistic regarding the prognosis of conduct disorder. Does this result suggest that medication is not beneficial for children with ADHD in the long term? What can account for it? In addition, why did children who were prescribed medication have more ADHD symptoms than those no longer using medication?

- 1 Langley K, Fowler T, Ford T, Thapar AK, van den Brink W, Harold G, et al. Adolescent clinical outcomes for young people with attention-deficit/hyperactivity disorder. *BJ Psychiatry* 2010; 196: 225-40.
- 2 Wilens TG, Faraone SV, Biederman J, Gunawardene S. Does stimulant therapy of attention-deficit/hyperactivity disorder delay later substance abuse? A meta-analytic review of the literature. *Pediatrics* 2002; 111: 1172-85.
- 3 Biederman J, Monuteaux MC, Spencer T, Wilens TG, Faraone SV, Do stimulants protect against psychiatric disorders in youth with ADHD? A 10-year follow-up study. *Pediatrics* 2009; 124: 11-8.

Rongxiang Yang, MD, Department of Child Psychology, The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, China. Email: rxyang@zjhu.edu.cn

doi: 10.1192/bip.1973.4.414

Authors' note We agree that the influence of prescribed medication on the long-term psychological outcomes associated

with ADHD is an interesting and important area of research. However, we regret that our study is not best placed to address these issues.

Our study utilised a naturalistic design, identifying children recently diagnosed with ADHD through child and adolescent mental health services and paediatric clinics in the UK. As such, no restrictions or controls were placed on the prescription or continuation of stimulant medication in this group. To adequately test the questions posed by Dr Yang, specifically designed trials are required – well beyond the scope of our article.

Our findings indicated that prescription of medication at follow-up was associated with higher rates of ADHD symptoms, but not with the other psychological outcomes we assessed (including conduct disorder and substance use). Because our study does not provide sufficient data on stimulant use over time and because the majority (90%) were prescribed stimulant medication at some point, we did not expand further on the reasons for these findings, nor can we speculate on why those prescribed medication at follow-up had more ADHD symptoms.

We are therefore grateful to Dr Yang for highlighting this important area for research, but regret that we cannot address these queries using our data.

Kate Langley, Department of Psychological Medicine and Neurology, School of Medicine, Cardiff University Health Park, Cardiff, CF14 4XN, UK (Email: langleyk@cf.ac.uk); Tom Fowler, Department of Psychological Medicine and Neurology, School of Medicine, Cardiff University, Tumpkin Road, Civil Health Group, Penrhos Medical School, University of Gwent, Aylk, Thrapar, Michael J Owen, Michael G. Clonowen, Anita Thegar, Department of Psychological Medicine and Neurology, School of Medicine, Cardiff University, UK

doi: 10.1192/bip.1973.4.414

#### Erasing trauma memories

Recent elegant research has raised the salient issue of altering traumatic memories and its treatment implications. Kihou et al<sup>1</sup> suggest that 'if emotional memory could be weakened or even erased, then we might be able to eliminate the root of many psychiatric disorders, such as post-traumatic stress disorder'. In a similar vein, Schiller et al<sup>2</sup> reported that 'fearful memories can be wiped out for at least a year using a drug-free technique'. The prospect of erasing distressing memories is indeed compelling and has led to widespread media coverage.

However, this issue elicits important ethical and clinical considerations: first, would we want to erase trauma memories, and second, is it clinically helpful to erase such memories? Loss of knowledge about the past or oneself may be ethically problematic, although reducing suffering clearly may take precedence. Our sense of self is constructed from autobiographical memories, and the authenticity of how they link and our trust in this narrative is important for well-being. Furthermore, losing memory can compromise a victim's ability to provide legal evidence: autonomy and beneficence may trump justice, but it would be better if the evidence could be used and the victim did not suffer.

Paradoxically, erasing memories of trauma may not in itself reduce suffering and could even lead to the reverse. In clinical cases where explicit memory of an event has been lost, for example owing to a severe head injury or drug rape (e.g. via flunitrazepam), extreme distress can ensue. The clinical literature suggests that avoidance of trauma memories is associated with worse rather than improved outcome.

We note that the data in the above papers do not in fact indicate memory 'erasure'. Rather, both studies found that fear

## **4 PACIENTES E MÉTODOS – ARTIGO 2**

### **4.1 DELINEAMENTO**

O estudo proposto foi do tipo caso-controle.

### **4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

O presente estudo foi conduzido em uma amostra de 531 voluntários (363 controles e 168 casos) de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 65 anos, que frequentaram o Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS. Os voluntários residiam no estado, e se dispuseram a ler e assinar a Carta Informativa (ANEXO A) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B), responder a entrevista, doar sangue, permitindo a utilização dos seus dados e amostra de sangue para fins de pesquisa

### **4.3 PERÍODO DA COLETA DOS DADOS**

A coleta dos dados, entrevista e amostra de sangue dos voluntários ocorreram em duas etapas, de março 2009 a agosto de 2010, por motivos operacionais.

O protocolo de extração do DNA foi alterado para minimizar a perda de amostras e para que fosse assegurada a qualidade e quantidade deste material que são requisitos indispensáveis para o uso da plataforma de genotipagem.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos voluntários de ambos os gêneros, caucasianos, fumantes e não fumantes, que não apresentavam co-morbidades psiquiátricas (transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, alcoólatras, usuários de outras drogas, retardo mental e síndromes genéticas), alfabetizados, que não estivessem em tratamento para tabagismo (medicamentoso ou não); que preenchessem os critérios para doação de sangue (ANEXO C), e realizaram a mesma, no período de coletas no Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS.

Foram excluídos os indivíduos não caucasianos, pois os polimorfismos relacionados ao tabagismo foram selecionados a partir de amostras de indivíduos com descendência européia; ex-fumantes, os que tiveram contra-indicação para doar sangue, pelos critérios exigidos pelo Banco de Sangue, ou se recusaram a participar da pesquisa, assim como doadores com parentesco entre si de primeiro e segundo grau, a fim de evitar viés de frequência gênica.

#### 4.5 ENTREVISTA

Todos os voluntários foram submetidos à entrevista (após o consentimento) para informarem sobre as características individuais (ANEXO D). As perguntas visavam classificar os indivíduos de acordo com as variáveis demográficas e variáveis relacionadas ao tabagismo (incluindo *status* tabágico e grau de dependência nicotínica).

##### 4.5.1 Variáveis demográficas

- Gênero.
- Idade atual (anos completos).



- Escolaridade (ensino fundamental, médio ou superior).
- Trabalho (ativo, aposentado, ou auxílio doença/desemprego).
- Renda familiar (em salários mínimos).
- Etnia (caucasóide)
- Estado civil (com companheiro fixo ou sem companheiro fixo).

#### **4.5.2 Variáveis relacionadas ao tabagismo**

- *Status* tabágico (não fumante ou fumante).
- Idade de início do uso do fumo (em anos).
- Tempo de uso do tabaco (em anos).
- Quantidade de cigarros fumados por dia (número de cigarros/dia).
- Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTDN).

##### 4.5.2.1 *Status* tabágico

Os voluntários foram classificados quanto ao *status* tabágico segundo critérios do *National Health Interview Survey-Cancer Control and Epidemiology Supplements* (NHIS-CCES), vinculado ao CDC(127). Os indivíduos não fumantes foram os que relataram nunca ter fumado ou que fumaram menos do que 100 cigarros ao longo de suas vidas. Os indivíduos fumantes foram os que relataram ter fumado pelo menos 100 cigarros durante suas vidas e que atualmente estavam fumando.

##### 4.5.2.2 Teste de Fagerström (FTDN)

Para os voluntários classificados como fumantes foi aplicado o Teste de Fagerström(128) (ANEXO E) que avalia o grau de dependência nicotínica. É um questionário constituído por seis (6) perguntas com alternativas para resposta. Cada alternativa corresponde a uma pontuação. Ao final foi somada a pontuação, que varia de 0 à 10, e uma tabela indica o grau de dependência nicotínica. Esta varia de muito baixo (menor pontuação) a muito alto (maior pontuação). No artigo 2 os indivíduos foram categorizados em três níveis: baixo grau de dependência nicotínica (0 à 3); moderado (4 à 7) e alto grau de dependência nicotínica (8 à 10).

#### 4.6 ANÁLISE LABORATORIAL

O sangue para os testes laboratoriais foi coletado pelos funcionários do Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS ao final da doação do sangue. Para o diagnóstico molecular dos polimorfismos genéticos, foram coletadas amostras de sangue de veia periférica pelo sistema de venoclise, com aparato descartável a vácuo (Vacutainer) e colocadas em tubos contendo EDTA 0,1% (volume final em concentração 1 mg/dl), em um total de 5 ml de sangue. Após a coleta, o material foi mantido a 4°C por no máximo 24 horas entre a coleta e a extração do DNA.

As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular pertencente ao Instituto de Pesquisa Biomédicas (IPB) localizado no Hospital São Lucas da PUCRS onde foi feita a extração do DNA. Após a extração do DNA das amostras, todo o material foi enviado em temperatura ambiente via FEDEX para a Universidade de Toronto, no Canadá, para que fossem genotipados os polimorfismos. Esta parceria entre as duas Universidades ocorreu devido à concessão de uma bolsa no Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE (Doutorado Sanduíche), de número 2504-08-1, fornecida pela CAPES com duração de um ano.

##### 4.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de sangue foi feita segundo protocolo do laboratório *Analytical Genetics Technology Centre* no Hospital *Princess Margareth* afiliado a Universidade de Toronto, de acordo com Herrmann e Frischauf(131). O método consiste de duas etapas: lise de hemácias e extração do DNA com precipitação em sal.

#### 4.6.1.1 Lise de hemácias

O sangue foi transferido do tudo de 5 ml com EDTA para um tubo Falcon de 15 ml. Foi adicionado 2 volumes de tampão de lise de hemácias composto de cloreto de amônio, bicarbonato de potássio, EDTA 0.5M e água. Após isso, inverteu-se o tubo gentilmente e incubou-se no gelo por 10 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado novamente o tampão de lise de hemácias, mas desta vez somente 5 ml em cada tubo. Inverteu-se delicadamente e centrifugou-se a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Ao final, o sobrenadante foi descartado. Se o pellet não estava na cor branca ou creme, a última etapa do procedimento era repetida. O *pellet* foi armazenado a -80°C ou seguia-se para a extração propriamente dita.

#### 4.6.1.2 Extração de DNA com Precipitação em Sal

Descongelava-se o pellet antes de iniciar o protocolo. Assim que descongelado, adicionou-se 3.6 ml de tampão de lise Nuclei-SDS-Proteinase-Mastermix, composto por cloreto de sódio 5M, ácido clorídrico 1M Tris-HCl no pH 8, EDTA 5M, Proteinase K, SDS 20% e água, por tubo e ressuspendeu-se o *pellet*. Incubou-se ao longo da noite a 50°C. No dia seguinte, adicionou-se 1 ml de cloreto de sódio 6M em cada tubo e misturou-se gentilmente durante 10 minutos. Centrifugou-se a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon de 15 ml contendo 2.5 volumes de etanol 100%. Inverteu-se o

tubo por 5 a 6 vezes. Removeu-se o DNA com uma alça bacteriológica descartável para um tubo eppendorf de 1.5 ml contendo 500 µl de etanol 70%. Centrifugou-se o tubo a 13000 rpm por 3 minutos. Retirou-se o excesso de etanol 70% e ressuspendeu-se o DNA em 200 µl de tampão TE 1X.

#### **4.6.2 Genotipagem MassARRAY iPLEX - SEQUENOM**

Para a genotipagem dos polimorfismos foi utilizado o método de iPLEX Gold(132) que consiste das seguintes etapas:

##### 4.6.2.1 SNPs selecionados para o Estudo

Neste estudo, um total de 21 SNPs foram genotipados usando a plataforma Sequenom<sup>®</sup> iPLEX MassARRAY em 531 amostras de uma população brasileira, caracterizada por caucasianos com descendência europeia. Os SNPs selecionados já foram previamente descritos e relacionados ao tabagismo em populações com descendência europeia e são possíveis genes candidatos a estarem envolvidos no mecanismo de adição.

Os SNPs estão descritos abaixo por ordem cromossômica.

##### **USH2A** *Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)*

Este gene está localizado no cromossomo 1 (1q41) e codifica uma proteína que pode ser importante na homeostase do ouvido e retina. Mutações neste gene vêm sendo associadas com a síndrome de Usher do tipo IIa e retinite pigmentosa(133). Em relação ao tabagismo, foi citado pela primeira vez em 2008 por Uhl *et al*(123) em um estudo de associação genômica ampla entre genética e sucesso na cessação do tabagismo. Vink *et al*(118) demonstraram associação do polimorfismo rs 12126638 com ser fumante atual.

**GRB14** *Growth factor receptor-bound protein 14*

Este gene está localizado no cromossomo 2 (2q22-q24) e codifica um proteína de um fator de crescimento que interage com receptores e fatores de crescimento de insulina. Esse tipo de proteína tem um efeito inibitório na sinalização dos receptores tirosina quinase e, em particular, na sinalização dos receptores de insulina. Este gene pode exercer um importante papel na sinalização de rotas de regulação do crescimento e metabolismo(134). Vink *et al*(118) demonstraram associação do polimorfismo rs4423615 com iniciação ao fumo e ser fumante atual.

**NR3C2** *Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2*

Este gene está localizado no cromossomo 4 (4q31.1) e codifica um receptor mineralcorticóide que media as ações da aldosterona no balanço hídrico e de sal(135). Berretini *et al*(96) associaram o polimorfismo rs5522 com o número de cigarros fumados por dia.

**DRD1** *Dopamine receptor D1*

Este gene está localizado no cromossomo 5 (5q35.1) e codifica o subtipo D1 do receptor da dopamina. Este receptor regula o crescimento e desenvolvimento neuronais, media algumas reações comportamentais e modula o subtipo D2. Huang *et al*(136) associaram os polimorfismos rs265973, rs686, e rs4532 com dependência nicotínica. Novac *et al*(137) associaram os polimorfismos rs4532 e rs686 com o número de cigarros fumados por dia.

**GRM6** *Glutamate receptor, metabotropic 6*

Este gene está localizado no cromossomo 5 (5q35) e é responsável pela neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central ao ser ativado por glutamato. O receptor de glutamato está envolvido na maioria das funções

cerebrais. Os receptores metabotrópicos de glutamato fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína-G e estão divididos em três grupos. O gene GRM6 faz parte do terceiro grupo e está relacionado a inibição da cascata de reações do AMP cíclico(138). Berretine *et al*(96) associaram o polimorfismo rs2645339 com o número de cigarros fumados por dia.

### **GRM8** *Glutamate receptor, metabotropic 8*

Este gene está localizado no cromossomo 7 (7q31.3-q32.1) e é responsável pela neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central ao ser ativado por glutamato. O receptor de glutamato está envolvido na maioria das funções cerebrais. Os receptores metabotrópicos de glutamato fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína-G e estão divididos em três grupos. O gene GRM8 faz parte do terceiro grupo e está relacionado à inibição da cascata de reações do AMP cíclico(139). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs2237781 com iniciação ao tabagismo e sua manutenção.

### **HTR5A** *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A*

Este gene está localizado no cromossomo 7 (7q36.1) que codifica uma proteína transmembrana do tipo multipassagem que funciona como um receptor para 5-hidroxitriptamina e se acopla a proteínas-G. O neurotransmissor serotonina (5-HT) vem sendo implicado em estudos de doenças psiquiátricas e também possui efeitos vasoconstritores e vasodilatadores(140). Saccone *et al*(99) associaram o polimorfismo rs6320 com dependência nicotínica.

### **MSRA** *Methionine sulfoxide reductase A*

Este gene está localizado no cromossomo 8 (8p23.1) e é responsável por reparar danos oxidativos a proteínas para restaurar a atividade biológica(141). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs4509385 com a iniciação ao tabagismo.

**CDH23** *Cadherin-related 23*

Este gene está localizado no cromossomo 10 (10q22) e é um membro da superfamília das caderinas, as quais os genes codificam glicoproteínas cálcio-dependentes que medeias a adesão célula-célula(142). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs10999845 com iniciação ao tabagismo.

**ANKK1** *Ankyrin repeat and kinase domain containing 1*

Este gene está localizado no cromossomo 11 (11q23.2) e codifica uma proteína que pertence a família das Ser/Thr proteínas quinase que está envolvida com sinalização intracelular(143). Gelernter *et al*(144) associaram o polimorfismo rs4938015 com dependência nicotínica.

**BDNF** *Brain-derived neurotrophic factor*

Este gene está localizado no cromossomo 11 (11p13) e codifica uma proteína que é membro da família do fator de crescimento de nervo. É induzida por neurônios corticais e é necessária para a sobrevivência dos neurônios estriatais no cérebro. A expressão desse gene está reduzida nos paciente com as doenças de Alzheimer e Huntington. Este gene pode estar envolvido na regulação da resposta ao estresse e na biologia das desordens de humor(145). Lang *et al*(146) revelaram que a frequência do polimorfismo rs6265 é maior em fumantes e ex-fumantes.

**LUZP2** *Leucine zipper protein 2*

Este gene está localizado no cromossomo 11 (11p14.3)(147). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs10834489 com a manutenção do tabagismo.

**MICAL2** *Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2.*

Este gene está localizado no cromossomo 11 (11p15.3)(148). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs17477949 com iniciação ao tabagismo.

**SLC1A2** *Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2*

Este gene está localizado no cromossomo 11 (11p13-p12) e codifica uma proteína que é membro da família das proteínas transportadoras de soluto. Estas proteínas transportam o glutamato do espaço extracelular nas sinapses, o que previne danos neurais provocados por excesso da ativação dos receptores de glutamato. Uma diminuição destas proteínas, ocasionada por uma mutação, está associada com esclerose lateral amiotrófica(149). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs10836358 com a manutenção da adicção.

**GRIN2B** *Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B*

Este gene está localizado no cromossomo 12 (12p12) e codifica uma classe de receptores ionotrópicos de glutamato, os receptores de NMDA. Estes receptores estão envolvidos em certos tipos de aprendizado e memória e possuem três diferentes subunidades: NR1 (GRIN1), NR2 (GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, ou GRIN2D) e NR3 (GRIN3A ou GRIN3B). A subunidade NR2 age como agonista no glutamato. Este receptor é o neurotransmissor excitatório mais predominante no cérebro dos mamíferos(150). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs7313149 com iniciação ao tabagismo.

**ACTN1** *Actinin, alpha 1*

Este gene está localizado no cromossomo 14 (14q24.1-q24.2; 14q24; 14q22-q24) que codifica a alfa actina que é um dos principais componentes do



citoesqueleto e é uma das proteínas predominantes no aparato de contração das células musculares. Também está envolvida no processo de plasticidade sináptica(151). Caporaso *et al*(119) associaram o polimorfismo rs2268983 com o número de cigarros fumados por dia.

### **TRIM9** *Tripartite motif-containing 9*

Este gene está localizado no cromossomo 14 (14q22.1) que codifica uma proteína membro da família tripartite. Sua função ainda não foi identificada(152). Vink *et al*(118) associaram o polimorfismo rs8009082 com a iniciação ao tabagismo.

### **CHRNA5** *Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5*

Este gene está localizado no cromossomo 15 (15q24) e codifica uma proteína que é uma subunidade do receptor nicotínico acetilcolina, e é membro da superfamília de canais iônicos abertos por ligante que mediam a rápida transmissão nas sinapses. Mutações neste gene estão associadas à suscetibilidade para o câncer do tipo 2(153). Caporaso *et al*(119) associaram o polimorfismo rs16969968 com o número de cigarros fumados por dia e dependência nicotínica. Saccone *et al*(154) associaram o mesmo polimorfismo com dependência nicotínica e Stevens *et al*(155) associaram com número de cigarros fumados por dia. Este polimorfismo também já foi associado ao numero de cigarros fumados por dia(96) e com câncer de pulmão(156).

### **CAMKK1** *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha*

Este gene se localiza no cromossomo 17 (17p13.2) e codifica a proteína pertencente a família da Ser/Thr proteína quinase e a superfamilia das proteínas quinase cálcio/calmodulina dependentes(157). Caporaso *et al*(119) associaram o polimorfismo rs758642 com o numero de cigarros fumados por dia.

**CABLES1** *Cdk5 and Abl enzyme substrate 1*

Este gene se localiza no cromossomo 18 (18q11.2) e codifica uma proteína quinase ciclina-dependente que participa da proliferação e diferenciação(158). Caporaso *et al*(119) associaram o polimorfismo rs11082304 com o numero de cigarros fumados por dia.

**COMT** *Catechol-O-methyltransferase*

Este gene se localiza no cromossomo 22 (22q11.21-q11.23; 22q11.21) codifica a enzima catecol-o-metiltransferase que degrada catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina). Também é importante no metabolismo de drogas derivadas de catecóis usadas no tratamento de hipertensão, asma e doença de Parkinson(159). Beuten *et al*(71) associaram o polimorfismo rs4680 com dependencia nicotínica.

4.6.2.2 Isolamento e quantificação do DNA

A extração de DNA foi feita com o método de precipitação em sal, como descrito anteriormente, e em seguida as amostras foram quantificadas usando o nanodrop. Certificou-se que o DNA estava puro através da relação A260/A280 que variou entre 1.7-2.0 evidenciando baixa contaminação de proteínas. Após a quantificação foram feitas soluções estoque das amostras com concentração de 50 ng/µl. O método de genotipagem utiliza entre 5 - 10 ng de DNA por reação.

4.6.2.3 Amplificação do DNA para genotipagem

Após certificada a quantidade e a qualidade do DNA das amostras, foi feito o processo de amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (no

inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR). Após a escolha dos SNPs, os primers de amplificação e os de extensão foram desenhados usando a plataforma de apoio do SEQUENOM.

#### Protocolo da reação de PCR

| Reagente                                   | Concentração em 5 $\mu$ L    | Volume (1 reação) |
|--|------------------------------|-------------------|
| Água                                       | NA                           | 0.8 $\mu$ L       |
| Tampão 10x PCR com 20 mM MgCl <sub>2</sub> | 1x (2 mM MgCl <sub>2</sub> ) | 0.5 $\mu$ L       |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                  | 2 mM                         | 0.4 $\mu$ L       |
| dNTP (25 mM cada)                          | 500 $\mu$ M                  | 0.1 $\mu$ L       |
| Primer (500 nM cada)                       | 100 nM                       | 1.0 $\mu$ L       |
| Enzima Taq (5 U/ $\mu$ L)                  | 1.0 U/reação                 | 0.2 $\mu$ L       |
| Volume total:                              |                              | 3.0 $\mu$ L       |

Após fazer a solução total, através de nanodispensadores, foi adicionado 3  $\mu$ L em cada poço de uma placa de 384 poços. Em seguida, foi adicionado 2  $\mu$ L de DNA genômico (5-10 ng/ $\mu$ L) e a placa foi centrifugada por 1 minuto a 3000 rpm. Após a centrifugação, a placa foi para o termociclador com a programação: 94° C por 2 minutos, 45 ciclos de 94° C por 30 segundos, 56° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, e 4° C ao término.

#### 4.6.2.4 Neutralização de dNTPs não incorporados (reação SAP)

A reação de PCR precisa primeiramente ser tratada com fosfatase alcalina de camarão (no inglês, *shrimp alkaline phosphatase* – SAP) para desfosforilar nucleotídeos que não foram incorporados nos produtos amplificados. A SAP cliva o fosfato dos dNTPs não incorporados, os convertendo em dNDPs, o que os torna indisponíveis para futuras reações.

### Protocolo da reação SAP

| Reagentes                          | Volume (1 reação)  |
|------------------------------------|--------------------|
| Água                               | 1.53 $\mu\text{L}$ |
| Tampão SAP (10x)                   | 0.17 $\mu\text{L}$ |
| Enzima SAP (1.7 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0.30 $\mu\text{L}$ |
| Volume total                       | 2.00 $\mu\text{L}$ |

Após fazer a solução total, através de nanodispensadores, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  em cada poço da placa de 384 poços que contém o produto amplificado. Centrifugou-se a placa por 1 minuto a 3000 rpm. Após a centrifugação, a placa foi para o termociclador com a programação: 37°C por 40 minutos, 85°C por 5 minutos, finalizando com 4°C.

O próximo passo é o preparo da reação iPLEX propriamente dita. Neste passo, também chamado de reação de extensão, uma reação de uma base de extensão (no inglês, *single base extension* – SBE) é realizada usando-se uma termo sequenase para incorporar ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados) diferenciados pela massa. Esta reação de extensão pós-PCR gera pequenos produtos de DNA que possuem valor de massa baseado em casa alelo, que no próximo processo será medido através do espectrômetro de massa.

#### 4.6.2.5 Criação da reação iPLEX (reação de extensão)

Protocolo da reação iPLEX:

| Reagente  | Concentração em 9 $\mu\text{M}$        | Volume (1 reação)    |
|---|--|----------------------|
| Água  | NA                                     | 0.7395 $\mu\text{L}$ |
| Tampão iPLEX Plus (10X)                         | 0.222X                                 | 0.2000 $\mu\text{L}$ |
| iPLEX termination Mix                           | 0.5X                                   | 0.1000 $\mu\text{L}$ |
| Primer Mix (7 $\mu\text{M}$ :14 $\mu\text{M}$ ) | 0.73 $\mu\text{M}$ :1.46 $\mu\text{M}$ | 0.9400 $\mu\text{L}$ |
| Enzima iPLEX                                    | 0.5X                                   | 0.0205 $\mu\text{L}$ |
| Volume total:                                   |  | 2.0000 $\mu\text{L}$ |

Após fazer a solução total, através de nanodispensadores, foi adicionado 2 µL em cada poço da placa de 384 poços que contém o produto amplificado e a reação com a SAP. Centrifugou-se a placa por 1 minuto a 3000rpm. Após a centrifugação, a placa foi para o termociclador com a programação: 94°C por 30 segundos, 40 ciclos de 94°C por 5 segundos, 52°C por 5 segundos e 80°C por 5 segundos (sendo esses 2 últimos repetir 5 ciclos) e 72°C por 3 minutos, finalizando com 4°C.

Ao final da reação iPLEX no termociclador, adicionou-se 16 µL de água em cada poço da placa e em seguida resina. Girou-se a placa por no mínimo 15 minutos. Depois centrifugou-se a placa por 5 minutos a 5000rpm.

#### 4.6.2.6 SpectroCHIP Array

Após realizado todo o protocolo iPLEX foram gerados pequenos produtos de DNA, através dos *primers* de extensão, que possuem valores de massa únicos baseados em cada alelo. Estes produtos de extensão foram plotados em um chip que auxilia na ionização dos produtos de DNA quando expostos ao laser de alta intensidade.

#### 4.6.2.7 Análise dos dados

O MALDI-TOF MS gera um espectro que contém picos produzidos pelos produtos de extensão. Os genótipos foram inferidos pela comparação dos picos de massas do espectro das massas pré-calculadas comparado com os produtos de extensão esperados. O resultado deste espectro é processado pelo software *Sequenom Typer Analyzer* que gera o resultado do genótipo de cada amostra.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos foram verificados através da média, desvio padrão e mediana usando o software SPSS. Para as análises das frequências alélicas e genotípicas em casos e controles foi utilizado o teste Qui-quadrado usando o software Plink (version 1.06). O nível de significância adotado foi de 0.05.

#### 4.8 ÉTICA

O estudo foi realizado após a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, com o protocolo de número CEP 08/04239, e seguiu as recomendações da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que dita às normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (ANEXO H e I). Os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



An analysis of 21 candidate genes in smoking behavior:  
further support for a role of SLCLA2 and ACTN1 variants.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | Addiction Biology   |
| Manuscript ID:                | Draft   |
| Wiley - Manuscript type:      | Original Article  |
| Date Submitted by the Author: | n/a   |
| Complete List of Authors:     | Santos, Vanessa; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Medicine<br>Charkin, Jose; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Medicine<br>Bau, Claiton; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetics<br>Sun, Ye; University of Toronto, Medicine<br>Zemel, Noa; University of Toronto, Medicine<br>Siminovitch, Katherine; University of Toronto, Medicine   |
| Keywords:                     | Genetics, Psychiatric disorders, Smoking  |
| Abstract:                     | Recent data from genome-wide association studies have identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with smoking behavior. In the present study, we investigated whether 21 positive signals from these studies are replicated in a sample of 168 smokers and 363 non-smokers from the Brazilian population. By genotyping with the Sequenom MassARRAY iPLEX platform and subsequent statistical analysis using Rink software, we show that two previously-reported smoking-associated gene SNP loci, in the SLCLA2 (rs1089688) and ACTN1 (rs2268983) genes, respectively, are associated with smoking behavior in our study population. These genes are involved in crucial aspects of nicotine dependence, glutamate system and synaptic plasticity, and as such, are biologically plausible candidates that merit further molecular analyses so as to clarify their potential role in smoking behavior.<br>Keywords: Genetics, psychiatry disorders, pulmonary disease, smoking |

An analysis of 21 candidate genes in smoking behavior: further support  
for a role of SLC1A2 and ACTN1 variants.

Vanessa Argondizo dos Santos<sup>1</sup>, José Miguel Chatkín, Claiton Henrique Dotto  
Bauz, Ye Sun<sup>4</sup>, Noe Zameli, Katherine Siminovich<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Department of Medicine, University of Toronto; <sup>4</sup>Departments of Immunology and Molecular Genetics, University of Toronto and Samuel Lunenfeld and Toronto General Hospital Research Institutes, Toronto, Ontario, Canada.

Correspondence to: José Miguel Chatkín. Av. Ipiranga 6690, room 315, 3<sup>rd</sup> floor, School of Medicine Graduation Office, Pontifícia Universidade Católica Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil. Email: [jmchatkin@pucrs.br](mailto:jmchatkin@pucrs.br)



## Abstract

Recent data from genome-wide association studies have identified several single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with smoking behavior. In the present study, we investigated whether 21 positive signals from these studies are replicated in a sample of 168 smokers and 363 non-smokers from the Brazilian population. By genotyping with the Sequenom MassARRAY iPLEX platform and subsequent statistical analysis using PLINK software, we show that two previously-reported smoking-associated gene SNP loci, in the SLC1A2 (rs1083658) and ACTN1 (rs2268983) genes, respectively, are associated with smoking behavior in our study population. These genes are involved in crucial aspects of nicotine dependence, glutamate system and synaptic plasticity, and as such, are biologically plausible candidates that merit further molecular analyses so as to clarify their potential role in smoking behavior.

**Keywords:** Genetics, psychiatry disorders, pulmonary disease, smoking.

## Introduction

Despite the well documented risks conferred by smoking, cigarette smoking remains highly prevalent in many populations, and continues to be the largest preventable cause of disease and premature death worldwide. It is estimated that there are currently over 1.3 billion smokers globally and that the number will grow to 1.6–1.9 billion by 2025 (Wipfli H and Samet JM, 2009). Nicotine is the main psychoactive substance in tobacco that underpins smoking addiction, but nicotine dependence reflects an interplay of neurobiological, environmental and genetic factors (Amos CI et al., 2010). Although the factors influencing smoking behavior are complex, data from large-scale population-based twin and family studies have established significant impact of genetic factors on individual differences in smoking habit (Li MD et al., 2003; Vink JM et al., 2004; Vink JM et al., 2005).

Identifying the specific loci that influence smoking behavior could provide important etiological insights and facilitate the development of treatments to further reduce smoking related mortality. Linkage, gene association and genome-wide association studies (GWAS) have identified many chromosomal regions and genes associated with smoking behaviors. Some data have been reproduced in multiple studies, but, in general, results of these analyses have been inconclusive, with few loci replicated in independent studies (Li MD, 2008).

Among the genetic studies, candidate and genome-wide association analyses have been the most widely-used strategy to search for genes for nicotine dependence (ND) and other smoking-related variables (Berrettini W et al., 2008; Bierut LJ et al., 2007; Liu QR et al., 2005; Uhl GR et al., 2008; Vink JM et al., 2009). One of the strongest genetic associations identified from such

## Addiction Biology

studies involves the CHRNA3-A5-B4 gene cluster at chromosome 15 which encodes NACHR receptors (Liu JZ et al., 2010). Another association involves genes related to nicotine metabolism, including the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene encoding CYP2A6, an enzyme responsible primarily for nicotine metabolism (Thorgeirsson TE et al., 2010). Associations of smoking behavior with the TTC12-ANKK1-DRD2 gene cluster, which is functionally linked to dopamine in the brain and with genes encoding glutamate receptors (GRIN2B, GRIK2 and GRM8) and transporters (SLC1A2), have also been reported (Vink JM et al., 2009). This latter association is consistent with increasing evidence for a crucial role of glutamate in the brain reward system and with nicotine roles in enhancing glutamate release and function (Nesic J et al., 2011).

These data have, however, been obtained primarily by studies of European and North American populations and thus require replication in other populations before generalizable conclusions can be drawn. We therefore assessed whether 21 of the SNPs identified in prior studies as being associated with smoking behavior are also associated with smoking phenotypes in the Brazilian population. The fact that this sample is composed of Brazilians of European descent permits the inclusion of our data in future meta-analysis.

## Materials and Methods

## Samples

To carry out a case-control association study, 531 unrelated study subjects were selected from blood donors who attended the São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul during the period from

March 2009 to August 2010. To be included in this study, subjects had to be Brazilians of European descent between the ages of 18 and 65 years. Former smokers and subjects currently using smoking cessation medication were excluded from the study. All subjects completed a standardized self-report questionnaire including demographic characteristics and smoking history. Subjects were considered to be smokers if they smoked at least 100 cigarettes over their lifetime and were smoking regularly at the time of the study. Non smokers were defined as individuals who had never smoked or who had smoked less than 100 cigarettes in their lifetime (CDC - Centers for Disease Control and Prevention, 1994).

Level of smoking severity in this cohort was assessed using the self-report six-item Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND), a test used widely to provide a quantitative determination of nicotine dependence (Heatherton TF et al., 1991). Individuals were categorized into 3 levels based on a 0 to 10 scoring scale: low nicotine dependence level (0 to 3); moderate (4 to 7) and high nicotine dependence level (8 to 10). The study protocol was approved by the local ethics committee and all subjects gave written informed consent. A summary of demographic characteristics of this sample is provided in Table 1.

#### Genotyping

The genotyping studies were performed at the Mount Sinai Hospital/University Health Network Gene Profiling Facility at Toronto, Canada. Genomic DNA was extracted from whole blood using the Hermann and Frischau method (Hermann BG and Frischau AM, 1987) and then genotyped

#### Addiction Biology

for 21 SNPs previously reported to be associated with smoking and known to be nonsynonymous SNPs, with minor allele frequencies of at least 1% (Table 2).

For SNP genotyping, multiplex SNP assays were designed using SpectroDesigner software, 5-10 ng DNA/subject then amplified by PCR and primer extension products generated using extension primer(s), DNA polymerase, and a deoxynucleotide and di-deoxynucleotide triphosphate cocktail. Amplified DNA was then spotted onto a 384 SpectroChip and analyzed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platform (Sequenom, San Diego, CA) (Sequenom, 2009).

#### Statistical Analysis

To control for genotyping quality, duplicate samples and negative controls were included in the analysis and each SNP had to pass the following criteria: (i) genotype missing rate < 10%, (ii) minor allele frequency > 1% and (iii) Hardy-Weinberg equilibrium of  $P > 10^{-4}$ . Chi-square tests of allele and genotype frequencies in cases and controls and testing of Hardy-Weinberg equilibrium for all individual SNPs were performed using Plink (version 1.06) software. Significance level was set at 0.05.

#### Results

Characteristics of the study subject population are presented in Table 1. As shown, the study subjects included 168 smokers and 363 non-smokers. Among the smokers, mean age of smoking onset was 17 years old ( $\pm$ SD=4.0), average number of cigarettes smoked per day was 14 ( $\pm$ SD=11.1), and Fagerstrom Test for Nicotine Dependence levels ranged from medium to

severe. Among the non-smokers, there were more male than female subjects and the percentage of subjects completing more than 11 years of schooling was higher than that of the smoking group (~40% vs. 32%,  $P=0.002$ ). However, the non-smoking group did not differ from the smoking group in relation to percentage of individuals in stable marital relationships or currently employed.

Results of genetic association data are shown in Table 3, with allele frequencies for cases and controls indicated for all 21 SNPs that passed all quality control criteria, including tests for Hardy–Weinberg equilibrium. These analyses revealed smokers and non-smokers to differ significantly in relation to the respective frequencies of two SNPs, specifically, the rs10836358 ( $P=0.047$ , OR=1.474) SNP at the SLC1A2 locus and the rs2268983 SNP ( $P=0.033$ , OR=1.333) at the ACTN1 locus. With respect to the SLC1A2 SNP, rs10836358, presence of a T allele was associated with a 1.474 times higher risk of being a smoker, while for the ACTN1 rs2268983 SNP, the A allele was associated with 1.333 times higher risk for smoking.

For the remaining 19 SNPs, odds ratio ranged from 1.001 (rs4680 in COMT) to 1.328 (rs2237781 in GRM8), but no statistically significant associations were detected.

#### Discussion

In this study, previously reported associations between smoking behavior and SLC1A2 and ACTN1 polymorphisms (Vink JM et al., 2009; Watkins SS et al., 2000) were replicated in a Brazilian sample. These data provide the first independent confirmation of these associations, suggesting that these two genes may be physiologically and clinically relevant to smoking behavior.

## Addiction Biology

Nicotine is known to produce a variety of “rewiring” subjective and cognitive effects (Levin ED et al., 2006). However, the neurobiological mechanisms underlying nicotine actions are not well understood, involving not only the direct action of nicotine at acetylcholine receptors, but also other complex neurotransmitter pathways (Watkins SS et al., 2000). Neurochemical studies have demonstrated that nicotine, at concentrations achieved during smoking, can act at presynaptic receptors (McGehee DS et al., 1995) to enhance the release and function of glutamate. Glutamate is the primary excitatory neurotransmitter in the brain (Monaghan DT et al., 1989). Alterations in the glutamate uptake system may increase extracellular glutamate levels and corresponding excitotoxicity pathology (Takahashi M et al., 1997). As is consistent with these findings, alterations in glutamatergic neurotransmission are thought to be involved in several neuropsychiatric disorders (such as schizophrenia, major depressive and bipolar disorders and alcoholism) (Vengeliene V et al., 2008).

Associations between smoking behavior and the specific SLC1A2 SNP studied here (rs10836358) as well as other SLC1A2 SNPs have been previously reported (Uhl GR et al., 2008; Vink JM et al., 2009). They are in keeping with major roles for the solute transporter protein family member encoded by SLC1A2 in clearing glutamate from the extracellular synaptic space in the central nervous system.

Association of the ACTN1 polymorphism rs2268983 with the number of cigarettes smoked per day has also been previously reported. The ACTN1 gene belongs to a superfamily that encodes cytoskeletal-related proteins and has been implicated in synaptic plasticity in mammalian brain (Walikonis RS et al.,

2001). Its association with smoking is in keeping with the importance of synaptic plasticity in the pathophysiology of addiction (Robinson TE and Kolb B, 2004) and of actin-rich structures such as dendritic spines in regulation of postsynaptic signaling and synaptic plasticity in the brain (Harris KM 1999).

Therefore, the two loci replicated in our association study correspond to highly plausible candidate genes for smoking behavior. The proteins encoding by these genes have potential individual influences on nicotine dependence, and may also have interactive effects with other brain functions. Structural and functional alterations of glutamatergic synapses, for example, may be related to altered synaptic signaling and plasticity, mechanisms that are generally involved in developmental, psychiatric, and neurologic disorders, including nicotine addiction (van Spronsen M and Hoogenraad CC, 2010).

The present findings, however, should be interpreted cautiously. The study depends, for example, on the analysis of "healthy" young Brazilian blood donors, but it is possible that other genes may be more relevant in smokers ascertained from clinical or psychiatric units. The sample size was also relatively small and it is possible that a broader definition of smoking phenotypes might yield different results. However, despite these caveats, the replication here of other association data and the high biological plausibility of the two candidate genes suggest that both genes should be further evaluated in relation to smoking behavior, with a focus on defining functional variants.

The current findings provide added evidence of the role for genetics in nicotine dependence as is predicted by heritability studies. Our findings also provide incentive for biologic analyses aimed at elucidating the pathways coupling these gene variants to specific smoking behaviors.



#### Addiction Biology

##### Authors contribution

VAS, biologist was responsible for collecting data, genotyping and writing the paper. JMC and CHDB, both physicians, were responsible for design of the study, writing the paper and assisted interpretation of findings. YS was responsible statistical analysis. NZ and KS, both physicians, provided critical revision of the manuscript. All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

##### Acknowledgement

This work was supported by an Ontario Research Excellence Fund grant (ORF RE-01-061) to KAS. KAS holds the Sherman Family Chair in Genomic Medicine and is also supported by a Canada Research Chair. The Brazilian authors (VAS, JMC, CHDB) received funding from the agencies Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES); Fundação de Auxílio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

## Reference

- Amos CI, Spitz MR, Cincipini P (2010). Chipping away at the genetics of smoking behavior. *Nat Genet* 42, 366-8.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Franca C, Chilcoat H, Waterworth D, Muglia P, Mooser V (2008). Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular Psychiatry* 13, 368-73.
- Bienert LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, Swan GE, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, Fugman D, Gate AM, Hinrichs AL, Konwicka K, Martin NG, Montgomery GW, Saccone NL, Saccone SF, Wang JC, Chase GA, Rice JP, Ballinger DG (2007). Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 16, 24-35.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (1994). Cigarette Smoking Among Adults - United States, 1992, and Changes in the Definition of Current Cigarette Smoking. *MMWR* 43, 342-6.
- Harris KM (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology* 9, 343-8.
- Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO (1991). The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *British Journal of Addiction* 86, 1119-27.
- Herrmann BG, Frischauf AM (1987). Isolation of genomic DNA. *Methods in Enzymology* 152, 180-3.

- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology* 184, 523-39.
- Li MD, Cheng R, Ma JZ, Swan GE (2003). A metaanalysis of estimated and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction* 98, 23-31.
- Li MD. (2008). Identifying susceptibility loci for nicotine dependence: 2008 update based on recent genome-wide linkage analyses. *Human Genetics* 123, 119-31.
- Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P (2010). Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity (Ox-GSK consortium). *Nat Genet* 42, 436-40.
- Liu QR, Drgon T, Walther D, Johnson C, Polaskaya O, Hess J, Uhl GR (2005). Pooled association genome scanning: validation and use to identify addiction vulnerability loci in two samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11864-9.
- McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269, 1692-6.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology* 29, 365-402.

Nesic J, Duka T, Rusted JM, Jackson A (2011). A role for glutamate in subjective response to smoking and its action on inhibitory control. *Psychopharmacology* epub ahead of print.

Robinson TE, Kolb B (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47, 33-46.

Sequenom      Sequenom      iPLEX      Gold      Application      Guide.  
[http://www.sequenom.com/Files/Genetic-Analysis--Graphics/iPLEX-Application-PDFs/iPLEX-Gold-Application-Guide-v2r1\\_2009.1-10-2011](http://www.sequenom.com/Files/Genetic-Analysis--Graphics/iPLEX-Application-PDFs/iPLEX-Gold-Application-Guide-v2r1_2009.1-10-2011).

Ref Type: Electronic Citation

Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D (1997). The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *The Journal of Experimental Biology* 200, 401-9.

Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, ENGAGE Consortium, et al (2010). Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior (ENGAGE consortium). *Nat Genet* 42, 448-53.

Uhl GR, Liu QR, Johnson C, Walther D, Rose JE, David SP, Niaura R, Lerman C (2008). Molecular genetics of successful smoking cessation: convergent genome-wide association study results. *Archives of General Psychiatry* 65, 683-93.

van Spronsen M, Hoogenraad CC (2010). Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Current Neurology and Neuroscience report* 10, 207-14.

Vengeliens V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology* 154, 299-315.

## Addiction Biology

- Vink JM, Beem AL, Posthuma D, Neale MC, Willemsen G, Kendler KS, Slagboom PE, Boomsma DI (2004). Linkage analysis of smoking initiation and quantity in Dutch sibling pairs. *The Pharmacogenomics Journal* 4, 274-82.
- Vink JM, Smit AB, Geus EJC, Sullivan P, Willemsen G, Hottenga J, Smit JH, Hoogendijk WJ, Zitman FG, Paltonen L, Kaprio J, Pedersen NL, Magnusson PK, Spector TD, Kyvik KO, Morley KI, Heath AC, Martin NG, Westendorp RG, Slagboom PE, Tiemeier H, Hofman A, Uitterlinden AG, Aulchenko YS, Amin N, van Duijn C, Penninx BW, Boomsma DI (2009). Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking. *The American Journal of Human Genetics* 84, 367-79.
- Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI (2005). Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behavior Genetics* 35, 397-406.
- Walikonis RS, Oguni A, Khorosheva EM, Jeng CJ, Asuncion FJ, Kennedy MB (2001). Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *The Journal of Neuroscience* 21, 423-33.
- Watkins SS, Koob GF, Markou A (2000). Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine & Tobacco Research* 2, 19-37.
- Wipfli H, Samet JM (2009). Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin Pharm Therap* 86, 263-71.

Table 1 Demographic characteristics of study subjects

|                           | Smokers<br>(N=168) | Non-smokers<br>(N=363) |
|---------------------------|--------------------|------------------------|
|                           | Mean (SD)          |                        |
| Age                       | 37.0 (11.9)        | 35.0 (11.6)            |
| Cigarettes/day            | 14.1 (11.1)        | -                      |
| Age of smoking onset      | 17.0 (4.0)         | -                      |
|                           | N(%)               |                        |
| Male*                     | 86 (51.2)          | 228 (62.8)             |
| Stable relationship       | 117 (69.6)         | 262 (72.2)             |
| Employed                  | 135 (80.4)         | 317 (87.3)             |
| 11+ years of schooling ** | 54 (32.1)          | 144 (39.7)             |
| FTND                      |                    | -                      |
| (Moderate/High)***        | 89 (53.6)          |                        |

\*P=0.02

\*\*P=0.002

\*\*\*FTND= Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: Moderate/High vs Low dependence nicotine level

Table 2 Characteristics of test SNPs

| Chr | Gene    | SNP        | Allele |
|-----|---------|------------|--------|
| 1   | USH2A   | rs12126698 | C/T    |
| 2   | GRB14   | rs4423615  | A/G    |
| 4   | NR3C2   | rs5522     | A/G    |
| 5   | DRD1    | rs4532     | C/T    |
| 5   | GRM6    | rs2645339  | C/T    |
| 7   | GRM8    | rs2237781  | A/G    |
| 7   | HTR5A   | rs6320     | A/T    |
| 8   | MSRA    | rs4509385  | C/T    |
| 10  | CDH23   | rs10999845 | A/G    |
| 11  | MIC AL2 | rs17477949 | C/T    |
| 11  | LUZP2   | rs10834489 | C/T    |
| 11  | BDNF    | rs6265     | A/G    |
| 11  | SLC1A2  | rs10836358 | C/T    |
| 11  | ANKK1   | rs4938015  | C/T    |
| 12  | GRIN2B  | rs7313149  | C/T    |
| 14  | TRIM9   | rs8009082  | A/C    |
| 14  | ACTN1   | rs2268983  | C/T    |
| 15  | CHRNA5  | rs16969968 | A/G    |
| 17  | CAMKK1  | rs758642   | C/T    |
| 18  | CABLES1 | rs11082304 | G/T    |
| 22  | CCMT    | rs4680     | A/G    |

Table 3 Genetic association data for 21 candidate SNPs for smoking behavior.

| Gene    | SNP        | Chr | Position  | Risk allele | F_A   | F_U   | P     | OR    |
|---------|------------|-----|-----------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| USH2A   | rs12126688 | 1   | 214242319 | C           | 0.222 | 0.217 | 0.839 | 1.034 |
| GRB14   | rs4423615  | 2   | 165146476 | G           | 0.519 | 0.474 | 0.182 | 1.199 |
| NR3C2   | rs5522     | 4   | 149576925 | C           | 0.125 | 0.111 | 0.512 | 1.145 |
| DRD1    | rs4532     | 5   | 174802756 | T           | 0.315 | 0.343 | 0.383 | 1.134 |
| GRM6    | rs2645339  | 5   | 178348669 | G           | 0.494 | 0.485 | 0.802 | 1.034 |
| GRM8    | rs2237781  | 7   | 126462286 | A           | 0.064 | 0.049 | 0.319 | 1.328 |
| HTR5A   | rs6320     | 7   | 154493554 | T           | 0.231 | 0.281 | 0.099 | 1.296 |
| MSRA    | rs4509385  | 8   | 10217606  | A           | 0.491 | 0.426 | 0.053 | 1.299 |
| CDH23   | rs10999945 | 10  | 72910867  | A           | 0.203 | 0.217 | 0.602 | 1.090 |
| ANKK1   | rs4938015  | 11  | 112769854 | C           | 0.345 | 0.362 | 0.593 | 1.078 |
| BDNF    | rs6265     | 11  | 27636492  | C           | 0.196 | 0.197 | 0.994 | 1.001 |
| LUZP2   | rs10834489 | 11  | 24794377  | T           | 0.412 | 0.391 | 0.548 | 1.090 |
| MICAL2  | rs17477949 | 11  | 12175779  | T           | 0.401 | 0.362 | 0.236 | 1.178 |
| SLC1A2  | rs10836358 | 11  | 35244076  | T           | 0.124 | 0.173 | 0.047 | 1.474 |
| GRIN2B  | rs7313149  | 12  | 13719554  | C           | 0.181 | 0.158 | 0.357 | 1.178 |
| ACTN1   | rs2268993  | 14  | 68478450  | A           | 0.548 | 0.471 | 0.033 | 1.333 |
| TRIM9   | rs8009082  | 14  | 50569094  | C           | 0.198 | 0.201 | 0.910 | 1.019 |
| CHRNA5  | rs16969968 | 15  | 76669980  | A           | 0.347 | 0.337 | 0.763 | 1.044 |
| CAMKK1  | rs758642   | 17  | 3733656   | A           | 0.352 | 0.347 | 0.875 | 1.022 |
| CABLES1 | rs11082304 | 18  | 18974971  | T           | 0.451 | 0.441 | 0.753 | 1.043 |
| COMT    | rs4680     | 22  | 18331271  | A           | 0.447 | 0.447 | 0.992 | 1.001 |

F\_A: minor allele frequency in affected cases

F\_U: minor allele frequency in unaffected controls



## 5 DISCUSSÃO

O tabagismo sofreu transformações nos últimos 20 anos. Passou de um comportamento social aceitável e difundido na sociedade a ser considerado uma doença. É um dos problemas de saúde pública mais importantes, e apesar de inúmeros estudos apontarem os prejuízos do fumo à saúde, persiste como uma das principais causas preveníveis de morte no mundo.

O hábito de fumar constitui um comportamento complexo e multifatorial que recebe influências de componentes genéticos e ambientais que se complementam. Descobriu-se que a nicotina é uma droga que apresenta alto poder de modificar a biologia do cérebro, sendo fortemente indutora de dependência. Como todas as outras dependências químicas, a nicotina envolve indivíduos que se encontram em alguma situação de vulnerabilidade: viúvos, indivíduos divorciados ou sem companheiro fixo, baixo nível sócio-econômico e cultural, minorias, desempregados, adolescentes e doentes mentais, entre outros.

Nas últimas décadas um grande número de estudos vem examinando a relação entre substâncias de abuso e doenças mentais, verificando que há uma relação de causalidade entre tabagismo e depressão. O que ainda não está claro é em que direção esta relação se dá. Alguns estudos verificaram que a depressão pode levar ao tabagismo, originando a hipótese da auto-medicação, em que os indivíduos com sintomas depressivos iniciam o tabagismo como uma maneira de amenizar os sintomas da doença; outros autores apóiam a idéia que o tabagismo causa a depressão inferindo que a nicotina modula a ação de receptores cerebrais que estariam relacionados ao desencadeamento de sintomas depressivos.

Essa última hipótese tem ganhado mais adeptos ultimamente(20;22). Em Dos Santos *et al*(160), artigo 1 desta tese, foi verificada associação entre tabagismo em fumantes atuais e sintomas depressivos e que o BDI de ex-fumantes foi significativamente menor que o de fumantes atuais. Este resultado é relevante, pois foi o primeiro estudo a incluir ex-fumantes para verificar a relação entre as duas variáveis. Verificou-se que o comportamento em relação a sintomas depressivos dos ex-fumantes se aproxima do padrão encontrado em não fumantes. Apesar de ser um estudo transversal, podemos inferir que o nosso resultado vai ao encontro de

resultados preliminares que revelaram que ex-fumantes tem melhor humor comparados com fumantes atuais. Se confirmada esta hipótese, em futuros estudos, este resultado de que a cessação do tabagismo não acarreta depressão em ex-fumantes poderá auxiliar na adoção de novas políticas de prevenção do tabagismo em adolescentes e novas técnicas de cessação do tabagismo em adultos.

A partir da hipótese de que depressão não ocasiona tabagismo na amostra de indivíduos estudada, nossa pesquisa se voltou para a investigação de fatores genéticos que pudessem estar associados ao tabagismo. Os estudos com gêmeos foram os primeiros que revelaram a associação da genética com o tabagismo. A partir destes estudos, juntamente com a decifração do genoma humano e avanços em técnicas de biologia molecular, iniciou-se a busca por variações genéticas que poderiam pré-dispor os indivíduos ao tabagismo. Estudos GWAS verificaram associação de variáveis relacionadas ao tabagismo com polimorfismos genéticos, os SNPs(99;117-119).

No artigo 2, verificamos o resultado da replicação de 21 polimorfismos genéticos previamente descritos e relacionados com tabagismo em populações com descendência europeia em uma amostra brasileira. Dois polimorfismos, o rs10836358 no gene *SLC1A2* e o rs2268983 no gene *ACTN1*, diferiram significativamente entre os indivíduos fumantes e não fumantes. O gene *SLC1A2* codifica uma proteína responsável pelo transporte do glutamato na fenda sináptica. Sabe-se que a nicotina promove a liberação de glutamato nos receptores pré-sinápticos. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro. Possíveis alterações na recaptação do glutamato podem fazer com que haja um aumento do mesmo na fenda sináptica ocasionando uma super excitação do sistema nervoso central. Pesquisas envolvendo o glutamato já o associaram a doenças neuropsiquiátricas como o alcoolismo, depressão e esquizofrenia. O gene *ACTN1* codifica uma proteína responsável pela formação do citoesqueleto e está envolvido na plasticidade sináptica que são modificações nas sinapses devido a estímulos, como a nicotina, ou neurotransmissores.

Este estudo demonstra o importante potencial que estes dois genes podem ter em relação ao tabagismo. Alterações estruturais e funcionais nas sinapses glutamatérgicas podem estar relacionadas a alterações na sinalização e plasticidade sinápticas que são mecanismos geralmente envolvidos no desenvolvimento de doenças psiquiátricas e neurológicas, incluindo o tabagismo.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Sabe-se que há uma relação entre tabagismo e depressão, mas o mecanismo envolvido nesta associação ainda não está totalmente elucidado. Este estudo evidenciou a associação entre tabagistas atuais e sintomas depressivos, e verificou que o BDI de ex-fumantes foi significativamente menor que o de fumantes atuais. Por ser um estudo transversal, não foi possível verificar a relação de causalidade entre tabagismo e sintomas depressivos. Estudos longitudinais serão necessários para a confirmação da direção desta relação. Outra possível linha de pesquisa a ser estudada é a investigação da relação entre sintomas depressivos e genética.

A partir do resultado preliminar do primeiro artigo, iniciou-se a procura por fatores genéticos que poderiam estar predispondo o tabagismo. Dois polimorfismos, rs10836358 no gene *SLC1A2* e o rs2268983 no gene *ACTN1*, previamente relacionados com a adição foram significativos em uma amostra brasileira. Ambos os genes podem ter fundamental importância no mecanismo da adição do tabagismo, pois estão envolvidos, respectivamente, no transporte do glutamato (neurotransmissor excitatório) na fenda sináptica e com plasticidade sináptica. Futuros estudos que repliquem estes polimorfismos em outras populações são fundamentais para que se afirme sua relação com o tabagismo. Também é de fundamental importância pesquisar genes candidatos a estarem envolvidos com o tabagismo nas rotas do glutamato bem como em genes relacionados à plasticidade sináptica, pois estas duas vias se mostraram importantes no processo de adição ao tabagismo.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Dorn HF. Tobacco consumption and mortality from cancer and other diseases. Public Health Reports 1959;74(7):581-94.
- (2) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Global Tobacco control. <http://www.cdc.gov/tobacco/global/index.htm> . 27-5-2010.
- (3) Yach D, Wipfli H. A century of smoke. Annals of Tropical Medicine & Parasitology 2006;100:465-79.
- (4) Doll R, Hill AB. Lung cancer and other causes of death in relation to smoking. British Medical Journal 1956;2(5001):1071-81.
- (5) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 1981;66(6):1191-308.
- (6) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Global Tobacco Surveillance System (GTSS). <http://www.cdc.gov/tobacco/global/gtss/index.htm> . 2010. 10-9-2010.
- (7) Warren CW, Lee J, Lea V, Goding A, O'Hara B, Carlberg M, et al. Evolution of the Global Tobacco Surveillance System (GTSS) 1998-2008. Global Health Promotion 2009 Sep;16(2):4-37.
- (8) WHO - World Health Organization. GATS (Global Adult Tobacco Survey). <http://www.who.int/tobacco/surveillance/gats/en/index.html> . 2010. 10-9-2010.
- (9) WHO - World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, The MPOWER package. <http://www.who.int/tobacco/mpower/2008/en/index.html> . 2008.
- (10) WHO - World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2009 - Implementing smoke-free environments. <http://www.who.int/tobacco/mpower/2009/en/index.html> . 2009. 10-12-2010.
- (11) Tobacco atlas. Male smoking. <http://www.tobaccoatlas.org/males.html> . 2010. 10-9-2010.
- (12) Tobacco atlas. Female smoking. <http://www.tobaccoatlas.org/females.html> . 2010. 10-9-2010.
- (13) Tobacco atlas. Boys' tobacco use. <http://www.tobaccoatlas.org/boys.html> . 2010. 10-9-2010.
- (14) Tobacco atlas. Girls' tobacco use. <http://www.tobaccoatlas.org/girls.html> . 2010. 10-9-2010.

- (15) Ministério da Saúde. VIGITEL 2010. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel\\_180411.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_180411.pdf) . 18-4-2011. 5-12-2011.
- (16) INCA - Instituto Nacional de Câncer. O controle do tabagismo no Brasil. [www.inca.gov.br/tabagismo/31maio2004/tabag\\_br\\_folheto\\_04.pdf](http://www.inca.gov.br/tabagismo/31maio2004/tabag_br_folheto_04.pdf) . 2010. 10-9-2010.

Ref Type: Online Source

- (17) Siahpush M, McNeill A, Hammond D, Fong GT. Socioeconomic and country variations in knowledge of health risks of tobacco smoking and toxic constituents of smoke: results from the 2002 International Tobacco Control (ITC) Four Country Survey. *Tobacco Control* 2006;15(3):65-70.
- (18) Kirchenchtejn C, Chatkin JM. Diretrizes para a cessação do tabagismo: dependência da nicotina. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2004;30(2):S11-S18.
- (19) Reichert J, Araujo AJ, Gonçalves CMC, Godoy I, Chatkin JM, Sales MPU, et al. Diretrizes para cessação do tabagismo. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2008;34(10):845-80.
- (20) Shahab L, West R. Do ex-smokers report feeling happier following cessation? Evidence from a cross-sectional survey. *Nicotine & Tobacco Research* 2009;11(5):553-7.
- (21) Boden JM, Fergusson DM, Horwood LJ. Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using longitudinal birth cohort. *The British Journal of Psychiatry* 2010;196(6):440-6.
- (22) Kang E, Lee J. A longitudinal study on the causal association between smoking and depression. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 2010;43(3):193-204.
- (23) Lasser K, Boyd JW, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormick D, Bor DH. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *The Journal of the American Medical Association* 2000;284(20):2606-10.
- (24) Glassman AH, Covey LS, Stetner F, Rivelli S. Smoking cessation and the course of major depression: a follow-up study. *Lancet* 2001;357(9272):1929-32.
- (25) Munafò MR, Araya R. Cigarette smoking and depression: a question of causation. *The British Journal of Psychiatry* 2010;196(6):425-6.
- (26) Rosemberg J, Rosemberg AMA, Moraes MA. Nicotina: droga universal. [www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf](http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/nicotina.pdf) , 1-178. 2003. 9-10-2010.

- (27) Khurana S, Batra V, Patkar AA, Leone FT. Twenty-first century tobacco use: it is not just a risk factor anymore. *Respiratory Medicine* 2003;97(4):295-301.
- (28) Lerman C, Niaura R. Applying genetic approaches to treatment of nicotine dependence. *Oncogene* 2002;21(48):7412-20.
- (29) Hong WK, Tyndale R, Spitz M. Biology of tobacco and smoking. In: ASCO, editor. Educational Book - 38th Annual Meeting. 2002. p. 4-17.
- (30) Batra V, Pakar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest* 2003;123(5):1730-6.
- (31) Hall W, Madden P, Lynskey M. The genetics of tobacco use: methods, findings and policy implications. *Tobacco Control* 2002;11(2):119-24.
- (32) Fisher RA. Lung Cancer and cigarettes. *Nature* 1958;182(4628):108.
- (33) Eaves LJ, Eysenck HJ. New approaches to the analysis of twin data and their application to smoking behavior. In: Maurice Temple Smith, editor. The causes and effects of smoking. London: 1980. p. 140-314.
- (34) Kaprio J, Hammar N, Koskenvuo M, Floderus-Myrhed B, Langinvainio H, Sarna S. Cigarette smoking and alcohol use in Finland and Sweden: a cross-national twin study. *International Journal of Epidemiology* 1982;11(4):378-86.
- (35) Hannah MC, Hopper JL, Mathews JD. Twin concordance for a binary trait: II; Nested analysis of ever-smoking and ex-smoking traits and unnested analysis of a "committed smoking" trait. *American Journal of Human Genetics* 1985;37(1):153-65.
- (36) Hayakawa K. Smoking and drinking discordance and health condition: Japanese identical twins reared apart and together. *Acta Geneticae Medicae et Gemellologiae* 1987;36(4):493-501.
- (37) Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R. Genetic influence on smoking: a study of male twins. *New England Journal of Medicine* 1992;327(12):829-33.
- (38) Osler M, Holst C, Prescott E, Sorensen TI. Influence of genes and family environment on adult smoking behavior assessed in an adoption study. *Genetic Epidemiology* 2001;21(3):193-200.
- (39) Hughes JR. Genetics of smoking: a brief review. *Behavior Therapy* 1986;17(4):335-45.
- (40) Li MD, Cheng R, Ma JZ, Swan GE. A metaanalysis of estimated and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction* 2003;98(1):23-31.

- (41) Maes HH, Sullivan PF, Bulik CM, Neale MC, Prescott CA, Eaves LJ, et al. A twin study of genetic and environmental influences on tobacco initiation, regular tobacco use and nicotine dependence. *Psychological Medicine* 2004;34(7):1251-61.
- (42) Rose R, Broms U, Korhonen T, Dick D, Kaprio J. Genetics of Smoking Behavior. *Handbook of Behavior Genetics*. 2009. p. 411-32.
- (43) Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI. Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behavior Genetics* 2005;35(4):397-406.
- (44) Vink JM, Beem AL, Posthuma D, Neale MC, Willemsen G, Kendler KS, et al. Linkage analysis of smoking initiation and quantity in Dutch sibling pairs. *The Pharmacogenomics Journal* 2004;4(4):274-82.
- (45) Vink JM, Willemsen G, Beem AL, Boomsma DI. The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence in a Dutch sample of daily smokers and ex-smokers. *Addictive Behaviors* 2005;30(3):575-9.
- (46) Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Lyons MJ, Tsuang M, TrueWR, et al. The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit. *Nicotine & Tobacco Research* 2003;5(2):245-54.
- (47) Pergadia ML, Heath AC, Martin NG, Madden PA. Genetic analyses of DSM-IV nicotine withdrawal in adult twins. *Psychological Medicine*, 2006;36:963-72.
- (48) Hatchell PC, Collins AC. The influence of genotype and sex behavioral sensitivity to nicotine in mice. *Journal of Psychopharmacology* 1980;71(1):45-9.
- (49) Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marumbio LM, Pich EM, et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 1998;391(6663):173-7.
- (50) Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, et al. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alfa-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotic currents. *The Journal of Neuroscience* 1997;17(23):9165-71.
- (51) Nabeshima T, Itoh A, Kobayashi K, Morita S, Mizuguchi T, Sawada H, et al. Effects of subacute administration of methamphetamine and nicotine on locomotor activity in transgenic mice expressing the human tyrosine hydroxylase gene. *Journal of Neural Transmission* 1994;97(1):41-9.
- (52) Munafò MR, Johnstone EC. Genes and cigarette smoking. *Addiction* 2008;103(6):893-904.
- (53) McMorrow MJ, Foxx RM. Nicotine's role in smoking: an analysis of nicotine regulation. *Psychological bulletin* 1983;93(2):302-27.

- (54) Tyndale RF, Pianezza ML, Sellers EM. A common genetic defect in nicotine metabolism decreases risk for dependence and lowers cigarette consumption. *Nicotine & Tobacco Research* 1999;1(Suppl 2):S63-S67.
- (55) Chatkin JM. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2006;35(6):573-9.
- (56) Carter B, Long T, Long T. A meta-analytic review of the CYP2A6 genotype and smoking behavior. *Nicotine & Tobacco Research* 2004;6(2):221-7.
- (57) Tyndale RF, Sellers EM. Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2001;29(4 Pt 2):548-52.
- (58) Xu C, Goodz S, Sellers EM, Tyndale RF. CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;54(10):1245-56.
- (59) Mwenifumbo JC, Lessov-Schlaggar CN, Zhou Q, Krasnow RE, Swan GE, Benowitz NL, et al. Identification of novel CYP2A6\*1B variants: the CYP2A6\*1B allele is associated with faster in vivo nicotine metabolism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2008;83(1):115-21.
- (60) Tricker AR. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 2003;183(1-3):151-73.
- (61) Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Impivaara O, et al. CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behaviour. *Pharmacogenetics* 2000;10(1):5-10.
- (62) Lee AM, Jepson C, Hoffmann E, Epstein L, Hawk LW, Lerman C, et al. CYP2B6 genotype alters abstinence rates in a bupropion smoking cessation trial. *Biological Psychiatry* 2007;15(62):635-41.
- (63) Nakajima M, Kuroiwa Y, Yokoi T. Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metabolism Reviews* 2002;34(4):865-77.
- (64) Tyndale RF, Sellers EM. Genetic variation in CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behaviour. *Therapeutic Drug Monitoring* 2002;24(1):163-71.
- (65) Morrison CF, Lee PN. A comparison of the effects of nicotine and physostigmine on a measure of activity in the rat. *Psychopharmacology* 1968;13(3):219-21.
- (66) Robinson SF, Marks MJ, Collins AC. Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Journal of Psychopharmacology* 1996;124(4):332-9.



- (67) Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996;382(6588):255-7.
- (68) Tyndale RF. Genetics of alcohol and tobacco use in humans. *Annals of Medicine* 2003;35(2):94-121.
- (69) Shield AJ, Thomaes BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Molecular Psychiatry* 2004;9(2):151-60.
- (70) Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews* 1999;51(4):593-628.
- (71) Beuten J, Payne TJ, Ma JZ, Li MD. Significant association of catechol-O-methyltransferase (COMT) haplotypes with nicotine dependence in male and female smokers of two ethnic populations. *Neuropsychopharmacology* 2006;31(3):675-84.
- (72) Shiels MS, Huang HY, Hoffman SC, Shugart YY, Bolton JH, Platz EA, et al. A community-based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-A). *Preventive Medicine* 2008;47(1):116-22.
- (73) Munafò MR, Freathy RM, Ring SM, St Pourcain B, Davey Smith G. Association of COMT Val108/158Met genotype and cigarette smoking in pregnant women. *Nicotine & Tobacco Research* 2011;13(2):55-63.
- (74) Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;326(2):378-86.
- (75) Yamada M, Yasuhara H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology* 2004;25(1-2):215-21.
- (76) Launay JM, Del Pino M, Chironi G, Callebert J, Peoc'h K, Mégnien JL, et al. Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation. *PLoS ONE* 2009;4(11):e7959.
- (77) Ito H, Hamajima N, Matsuo K, Okuma K, Sato S, Ueda R, et al. Monoamine oxidase polymorphism and smoking behaviour in Japanese. *Pharmacogenetics* 2003;13(2):73-9.
- (78) Jin Y, Chen D, Hu Y, Guo S, Sun H, Lu A, et al. Association between monoamine oxidase gene polymorphism and smoking behaviour in Chinese males. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 2006;9(5):557-64.

- (79) VanNess SH, Owens MJ, Kilts CD. The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *BMC Genetics* 2005;27:6-55.
- (80) Sieminska A, Buczkowski K, Jassem E, Niedoszytko M, Tkacz E. Influences of polymorphic variants of DRD2 and SLC6A3 genes, and their combinations on smoking in Polish population. *BMC Medical Genetics* 2009;10(92).
- (81) Zuo Y, Gilbert DG, Rabinovich NE, Riise H, Needham R, Huggenvik JI. DRD2-related TaqIA polymorphism modulates motivation to smoke. *Nicotine & Tobacco Research* 2009;11(11):1321-9.
- (82) David SP, Munafò MR. Genetic variation in the dopamine pathway and smoking cessation. *Pharmacogenomics* 2008;9(9):1307-21.
- (83) Noble EP. The DRD2 gene in psychiatric and neurological disorders and its phenotypes. *Pharmacogenomics* 2000;1(3):309-33.
- (84) Porrás G, Di Matteo V, Fracasso C, Lucas G, De Deurwaerdère P, Caccia S, et al. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C/2B</sub> receptor subtypes modulate dopamine release induced in vivo by amphetamine and morphine in both the rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology* 2002;26(3):311-24.
- (85) do Prado-Lima PA, Chatkin JM, Taufer M, Oliveira G, Silveira E, Neto CA, et al. Polymorphism of 5HT<sub>2A</sub> serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction. *American Journal of Medical Genetics: part B Neuropsychiatric Genetics* 2004;129B(1):90-3.
- (86) Poleskaya OO, Sokolov BP. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *Journal of Neuroscience Research* 2002;67(6):812-22.
- (87) Polina ER, Contini V, Hutz MH, Bau CH. The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug and Alcohol Dependence* 2009;101(1-2):128-31.
- (88) White MJ, Young RM, Morris CP, awford BR. Cigarette smoking in young adults: The influence of the HTR<sub>2A</sub> T102C polymorphism and punishment sensitivity. *Drug and Alcohol Dependence* 2011;114(2-3):140-6.
- (89) Chu SL, Xiao D, Wang C, Jing H. Association between 5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region and smoking behavior in Chinese males. *Chinese Medical Journal* 2009;122(12):1365-8.
- (90) Lerman C, Caporaso NE, Audrain J, Main D, Boyd NR, Shields PG. Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoking practices and nicotine dependence. *Molecular Psychiatry* 2000;5(2):189-92.

- (91) Lerman C, Caporaso N, Bush A, Zheng YL, Audrain J, Main D, et al. Tryptophan hydroxylase gene variant and smoking behavior. *American Journal of Medical Genetics* 2001;(105):6-518.
- (92) Reuter M, Hennig J. Pleiotropic effects of the TPH A779C polymorphism on nicotine dependence and personality. *American Journal of Medical Genetics* 2005;134(1):20-4.
- (93) Whitten L. Studies link family of genes to nicotine addiction. *NIDA Notes* 2009;22(6):1-14.
- (94) Schlaepfer IR, Hoft NR, Ehringer MA. The genetic components of alcohol and nicotine co-addiction: from genes to behavior. *Current Drug Abuse Reviews* 2008;1(2):124-34.
- (95) Zeiger J, Haberstick BC, Schlaepfer I, Collins AC, Corley RP, Crowley TJ, et al. The neuronal nicotinic receptor subunit genes(CHRNA6 and CHRNA3) are associated with subjective responses to tobacco. *Human Molecular Genetics* 2008;17(5):724-34.
- (96) Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, et al. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular Psychiatry* 2008;13(4):368-73.
- (97) Hoft NR, Corley RP, McQueen MB, Schlaepfer IR, Huizinga D, Ehringer MA. Genetic association of the CHRNA6 and CHRNA3 genes with tobacco dependence in a nationally representative sample. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(3):698-706.
- (98) Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008;452(7187):638-42.
- (99) Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Human Molecular Genetics* 2007;16(1):36-49.
- (100) Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausern A, Dunn DM, Matsunami N, et al. A Candidate Gene Approach Identifies the CHRNA5-A3- B4 Region as a Risk Factor for Age-Dependent Nicotine Addiction. *PLoS Genetics* 2008;4(7):e1000125.
- (101) Schwartz AG, Cote ML, Wenzlaff AS, Land S, Amos CI. Racial differences in the association between SNPs on 15q25.1, smoking behavior, and risk of non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2009;4(10):1195-201.
- (102) Li MD, Xu Q, Lou XY, Payne TJ, Niu T, Ma JZ. Association and interaction analysis of variants in CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster with nicotine dependence in African and European Americans. *American Journal*

- of Medical Genetics: part B Neuropsychiatric Genetics 2010;153B(3):745-56.
- (103) Garrison GD, Dugan SE. Varenicline: a first-line treatment option for smoking cessation. *Clinical Therapeutics* 2009;31(3):463-91.
- (104) Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273(5881):1516-7.
- (105) Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234(2):177-86.
- (106) Chen R, Davydov EV, Sirota M, Butte AJ. Non-Synonymous and Synonymous Coding SNPs Show Similar Likelihood and Effect Size of Human Disease Association. *PLoS ONE* 2010;5(10):e13574.
- (107) Li MD. Identifying susceptibility loci for nicotine dependence: 2008 update based on recent genome-wide linkage analyses. *Human Genetics* 2008;123(2):119-31.
- (108) Swan GE, Hops H, Wilhelmsen KC, Lessov-Schlaggar C, Cheng L, Hudmon KS, et al. A genome-wide screen for nicotine dependence susceptibility loci. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 2006;141B(4):354-60.
- (109) Li MD, Ma JZ, Payne TJ, Lou XY, Zhang D, Dupont RT, et al. Genome-wide linkage scan for nicotine dependence in European Americans and its converging results with African Americans in the Mid-South Tobacco Family sample. *Molecular Psychiatry* 2008;13(4):407-16.
- (110) Han S, Gelernter J, Luo X, Yang BZ. Meta-analysis of 15 genome-wide linkage scans of smoking behavior. *Biological Psychiatry* 2010;67(1):12-9.
- (111) Vink JM, Posthuma D, Neale MC, Slagboom PE, Boomsma DI. Genome-wide linkage scan to identify loci for age at first cigarette in dutch sibling pairs. *Behavior Genetics* 2006;36(1):101-11.
- (112) Saccone SF, Pergadia ML, Loukola A, Broms U, Montgomery GW, Wang JC, et al. Genetic linkage to chromosome 22q12 for a heavy-smoking quantitative trait in two independent samples. *The American Journal of Human Genetics* 2007;80(5):856-66.
- (113) Bierut LJ, Madden PAF, Breslau N, Johnson EO, Pomerleau O, Swan GE, et al. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Human Molecular Genetics* 2007;16(1):24-35.
- (114) Spitz MR, Amos CI, Dong Q, Lin J, Wu X. The CHRNA5-A3 region on chromosome 15q24-25.1 is a risk factor both for nicotine dependence and for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100(21):1552-6.

- (115) Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al. The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research* 2009;69(17):6848-56.
- (116) Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, et al. Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(9):1921-31.
- (117) Furberg H. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature Genetics* 2010;42(5):441-7.
- (118) Vink JM, Smit AB, Geus ECJ, Sullivan P, Willemsen G, Hottenga J, et al. Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking. *The American Journal of Human Genetics* 2009;84(3):367-79.
- (119) Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, et al. Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS ONE* 2009;4(2):e4653.
- (120) Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF., Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, et al. Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nature Genetics* 2010;42(5):448-53.
- (121) Sorice R, Bione S, Sansanelli S, Ulivi S, Athanasakis E, Lanzara C, et al. Association of a variant in the CHRNA5-A3-B4 gene cluster region to heavy smoking in the Italian population. *European Journal of Human Genetics* 2011;Epub ahead of print.
- (122) Uhl GR, Liu QR, Drgon T, Johnson C, Walther D, Rose JE. Molecular genetics of nicotine dependence and abstinence: whole genome association using 520,000 SNPs. *BMC Genetics* 2007;8:10.
- (123) Uhl GR, Liu QR, Johnson C, Walther D, Rose JE, David SP, et al. Molecular genetics of successful smoking cessation: convergent genome-wide association study results. *Archives of General Psychiatry* 2008;65(6):683-93.
- (124) Baker TB, Weiss RB, Bolt D, von Niederhausen A, Fiore MC, Dunn DM, et al. Human neuronal acetylcholine receptor A5-A3-B4 haplotypes are associated with multiple nicotine dependence phenotypes. *Nicotine & Tobacco Research* 2009;11(7):785-96.
- (125) Freathy RM, Ring SM, Shields B, Galobardes B, Knight B, Weedon MN, et al. A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) is associated with a reduced ability of women to quit smoking in pregnancy. *Human Molecular Genetics* 2009;18(15):2922-7.
- (126) Abecasis G, Kwong-Hang Tam P, Bustamante CD, Ostrander EA, Scherer SW, Chanock SJ, et al. *Human Genome Variation* 2006: emerging views on

- structural variation and large-scale SNP analysis. *Nature Genetics* 2007;39(2):153-5.
- (127) CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette Smoking Among Adults -- United States, 1992, and Changes in the Definition of Current Cigarette Smoking. *MMWR - Weekly* 1994;43(19):342-6.
- (128) Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *British Journal of Addiction* 1991;86(9):1119-27.
- (129) Beck AT, Steer RA, Carbin MG. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clinical Psychology Review* 1988;8(1):77-100.
- (130) Gorenstein C, Andrade L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjectschometric properties of the beck Depression Inventory: twenty-five years of evaluation . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1996;29(4534):457.
- (131) Herrmann BG, Frischauf AM. Isolation of genomic DNA. *Methods in Enzymology* 152, 180-183. 1987.
- (132) SEQUENOM. iPLEX<sup>®</sup> Gold Application Guide . <http://www.sequenom.com/Files/Genetic-Analysis---Graphics/iPLEX-Application-PDFs/iPLEX-Gold-Application-Guide-v2r1> . 2009. 10-1-2011.
- (133) NCBI. USH2A Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=7399](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=7399) . 1-11-2010. 18-11-2010.
- (134) NCBI. GRB14 growth factor receptor-bound protein 14. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=2888](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=2888) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (135) NCBI. NR3C2 nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=4306](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=4306) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (136) Huang W, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Dupont RT, Li MD. Significant association of DRD1 with nicotine dependence. *Human Genetics* 2008;123(2):133-40.
- (137) Novak G, LeBlanc M, Zai C, Shaikh S, Renou J, DeLuca V, et al. Association of polymorphisms in the BDNF, DRD1 and DRD3 genes with tobacco smoking in schizophrenia. *Annal of Human Genetics* 2010;74(4):291-8.

- (138) NCBI. GRM6 glutamate receptor, metabotropic 6. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=2916](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=2916) . 1-11-2010. 18-11-2010.
- (139) NCBI. GRM8 glutamate receptor, metabotropic 8. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=2918](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=2918) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (140) NCBI. HTR5A 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3361> . 1-11-2010. 18-11-2010.
- (141) NCBI. MSRA methionine sulfoxide reductase A. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=4482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=4482) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (142) NCBI. CDH23 cadherin-related 23. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=64072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=64072) . 8-11-2010. 18-11-2010.
- (143) NCBI. ANKK1 ankyrin repeat and kinase domain containing 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/255239> . 1-11-2010. 18-11-2010.
- (144) Gelernter J, Yu Y, Weiss R, Brady K, Panhuysen C, Yang B, et al. Haplotype spanning TTC12 and ANKK1, flanked by the DRD2 and NCAM1 loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Human Molecular Genetics* 2006;15(24):3498-507.
- (145) NCBI. BDNF brain-derived neurotrophic factor. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/627> . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (146) Lang UE, Sander T, Lohoff FW, Hellweg R, Bajbouj M, Winterer G, et al. Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology* 2007;190(4):433-9.
- (147) NCBI. LUZP2 leucine zipper protein 2. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=338645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=338645) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (148) NCBI. MICAL2 microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=9645](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=9645) . 1-11-2010. 18-11-2010.
- (149) NCBI. SLC1A2 solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6506> . 15-11-2010. 18-11-2010.
- (150) NCBI. GRIN2B glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2904> . 16-11-2010. 18-11-2010.

- (151) NCBI. ACTN1 actinin, alpha 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/87> . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (152) NCBI. TRIM9 tripartite motif-containing 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114088> . 8-11-2010. 18-11-2010.
- (153) NCBI. CHRNA5 cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1138> . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (154) Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, et al. Multiple Distinct Risk Loci for Nicotine Dependence Identified by Dense Coverage of the Complete Family of Nicotinic Receptor Subunit (CHRN) Genes. *American Journal of Medical Genetics: part B Neuropsychiatric Genetics* 2009;150B(4):453-66.
- (155) Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, et al. Nicotinic Receptor Gene Variants Influence Susceptibility to Heavy Smoking. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2008;17(12):3517-25.
- (156) Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics* 2008;40(5):616-22.
- (157) NCBI. CAMKK1 calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=84254](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=84254) . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (158) NCBI. CABLES1 Cdk5 and Abl enzyme substrate 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/91768> . 16-11-2010. 18-11-2010.
- (159) NCBI. COMT catechol-O-methyltransferase. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312> . 14-11-2010. 18-11-2010.
- (160) Dos Santos VA, Migott AM, Bau CH, Chatkin JM. Tobacco smoking and depression: results of a cross-sectional study. *The British Journal of Psychiatry* 2010;197:413-4.



## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Carta Informativa

Estamos realizando uma pesquisa intitulada **“ESTUDO DOS POLIMORFISMOS 5HT2C DO RECEPTOR DA SEROTONINA E DRD3 DO RECEPTOR DA DOPAMINA, DEPRESSÃO E STATUS TABÁGICO”**. Este trabalho faz parte do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde – Curso de Doutorado da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

A partir de agora, um profissional lhe fará perguntas referentes a seus dados demográficos e será aplicado um teste para dependência nicotínica (Teste de Fagerström - FTDN) no momento da doação e coleta de sangue. O teste de Fagerström é um questionário com seis (6) perguntas que fornecerá o grau de dependência de nicotina, no qual, depois da leitura, deve-se assinalar no espaço em branco um X com a resposta que mais se encaixa no seu caso. A entrevista consta de dados como data de nascimento, sexo, escolaridade, atividade profissional, renda familiar, estado civil, se é fumante ou não, idade de início do tabagismo, quantidade de cigarros fumada por dia dentre outras.

Após a entrevista, no momento da doação, será coletado uma amostra de cerca de 5 ml do sangue periférico para que seja possível a identificação dos polimorfismos de interesse da pesquisa. A amostra de sangue será encaminhada ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas, para serem realizadas as análises. Estas análises constam primeiramente na extração do DNA e subsequente genotipagem dos polimorfismos de interesse, para que então, juntamente com os dados da entrevista, seja possível o cruzamento dos dados e formulação das conclusões.

É importante ressaltar que a pesquisa não acarretará riscos a sua pessoa, embora possa ocorrer algum desconforto (ansiedade ou angústia) ao responder os questionários ou no momento da doação de sangue. A não concordância em participar deste estudo não irá alterar de maneira alguma a sua intenção voluntária de doação de sangue. Informamos que não acarretará ônus para quem participar deste estudo. Os testes e a coleta de sangue ocorrerão no Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS em uma sessão com dia e horário fixos, feita em uma única coleta, diretamente realizada pelos funcionários do hospital. Asseguramos desde já o sigilo, anonimato absoluto, acerca de todas as informações coletadas durante a pesquisa e a privacidade quanto aos dados confidenciais da mesma.

Os resultados da pesquisa serão comunicados através de publicações científicas e de participações em eventos científicos, preservando a imagem e a auto-estima da população pesquisada. Caso algum participante queira ter acesso aos seus resultados, eles serão fornecidos individualmente em entrevista previamente agendada junto à pesquisadora. Maiores informações poderão ser adquiridas junto à pesquisadora Vanessa A. dos Santos no telefone (51) 3320-3000 no ramal 2364, seu orientador Dr. José M. Chatkin, no telefone (51) 3320-3000 no ramal 3378, ou através do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS no telefone (51) 3320-3345.

## ANEXO B

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa intitulada “**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS 5HT2C DO RECEPTOR DA SEROTONINA E DRD3 DO RECEPTOR DA DOPAMINA, DEPRESSÃO E STATUS TABÁGICO**”, além de amostra de sangue que será coletada diretamente pelos funcionários do Banco de Sangue no momento da doação, em coleta única.

Estou ciente que este trabalho implica em comparecer uma única vez para entrevista, aplicação de escalas e para coleta de sangue.

Foi-me informando e assegurado: o anonimato e confidencialidade das informações por mim prestadas durante o estudo; o direito de me retirar do estudo, sem que isto implique em nenhum prejuízo para minha pessoa, e que poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar; que caso existam danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei o direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei; que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa; o objetivo da pesquisa de maneira clara e detalhada; que caso eu tiver novas perguntas sobre o estudo, posso chamar o pesquisador ao telefone para qualquer pergunta; que a necessidade de ler as informações ao voluntário que detalha o estudo e meus direitos, uma cópia das informações do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente

\_\_\_\_\_  
Local

\_\_\_\_\_  
Data

## ANEXO C

### **CrITÉRIOS para doaÇÃO de sangue do Banco de sangue do Hospital sãO Lucas da PUCRS**

#### **Exigências para o Doador:**

- Apresentar documento de identidade com foto (carteira de identidade, profissional ou de motorista);
- Idade entre 18 e 65 anos;
- Peso mÍnimo de 50 kg;
- NãO estar em jejum;
- NãO ter ingerido bebida alcoÓlica 24 horas antes da doaÇãO;
- NãO ter fumado cigarro pelo menos duas horas antes da doaÇãO;
- Gozar de boa saúde;
- NãO ter doado sangue nos últimos 90 dias para homens e 120 dias para mulheres;
- NãO ter se submetido a grandes cirurgias nos últimos seis meses, pequenas cirurgias nos últimos trÊs meses ou extraÇãO e tratamento dentário nas últimas 72 horas;
- NãO ter apresentado manifestaÇões ativas de alergias ou asma;
- NãO ter recebido transfusãO nos últimos 12 meses;
- NãO estar gripado ou com febre;
- NãO ter tido hepatite ou icterícia;
- NãO ter tido doenÇa de Chagas, sífilis ou malária;
- NãO ter feito tatuagem e/ou piercing nos últimos 12 meses.

#### **Fluxograma da coleta de sangue**

- RecepÇãO: é preenchido um cadastro com os dados pessoais.
- Micro-hematÓcrito (prÉ-triagem): exames de verificaÇãO de peso, altura, pressãO arterial e hematÓcrito.
- Triagem: entrevista mÉdica.
- Sala de coleta: em torno de 5 a 15 minutos sãO coletados aproximadamente 450 ml de sangue.
- Sala de lanche: apÓs a doaÇãO é oferecido um lanche ao doador.

#### **Etapas de liberaÇãO do material biolÓgico para a doaÇãO**

##### **Fracionamento:** separaçãO dos componentes do sangue

- Concentrado de hemácias: destinado a pessoas com anemia ou hemorragias. A bolsa tem duraÇãO de 35 dias.
- Concentrado de plaquetas: destinados a pessoas com leucemia ou problemas de coagulaÇãO. A bolsa tem duraÇãO de 5 dias.
- Plasma: utilizado para repor volume e/ou proteÍnas. A bolsa tem duraÇãO de 12 meses.

**Imunologia:** tipagem sanguínea (sistema AB0 e fator RH).

**Sorologia:** exames de sífilis, doenÇa de Chagas, hepatite B e C, HTLV, e HIV.

## ANEXO D

### Questionário - Entrevista

Nº paciente \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do Entrevistado (completo): \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

1. Sexo: ( ) masculino ( ) feminino
2. Idade atual (anos): \_\_\_\_\_
3. Escolaridade: ( ) Ensino Fundamental ( ) Ensino Médio ( ) Ensino Superior
4. Trabalho: ( ) ativo ( ) aposentado ( ) auxílio doença/desemprego
5. Renda familiar (nº em salários mínimos): \_\_\_\_\_
6. Etnia: ( ) caucasóide ( ) não caucasóide
7. Estado Civil: ( ) com companheiro fixo ( ) sem companheiro fixo
8. *Status* tabágico: ( ) não fumante ( ) fumante
9. Idade que começou a fumar (anos): \_\_\_\_\_
10. Quanto tempo de uso do tabaco: \_\_\_\_\_
11. Quantos cigarros fuma/dia: \_\_\_\_\_ e/ou nº de carteiras: \_\_\_\_\_

## ANEXO E

### Teste de Dependência Nicotínica de Fagerström (FTDN)

1. Quanto tempo depois de levantar da cama você fuma o seu primeiro cigarro?
  - ( ) menos de 5 minutos (0 ponto)
  - ( ) 6 a 30 minutos (1 ponto)
  - ( ) 31 a 60 minutos (2 pontos)
  - ( ) mais de 60 minutos (3 pontos)
2. Você considera difícil evitar fumar em locais onde isto é proibido (por exemplo, na igreja, biblioteca, cinema...)?
  - ( ) sim (1 ponto)
  - ( ) não (0 ponto)
3. A qual cigarro é mais difícil resistir?
  - ( ) o primeiro do dia (1 ponto)
  - ( ) qualquer outro (0 ponto)
4. Quantos cigarros você fuma por dia?
  - ( ) 10 ou menos (0 ponto)
  - ( ) 11 a 20 (1 ponto)
  - ( ) 21 a 30 (2 pontos)
  - ( ) 31 ou mais (3 pontos)
5. Você fuma mais frequentemente nas primeiras horas depois de acordar do que durante o resto do dia?
  - ( ) sim (1 ponto)
  - ( ) não (0 ponto)
6. Você fuma se estiver doente a ponto de ficar de cama a maior parte do dia?
  - ( ) sim (1 ponto)
  - ( ) não (0 ponto)

#### **Resultado do Teste**

| <b>Pontuação</b> | <b>Classificação</b> |
|------------------|----------------------|
| 0 a 2 pontos     | Muito baixa          |
| 3 a 4 pontos     | Baixa                |
| 5 a 6 pontos     | Moderada             |
| 6 a 7 pontos     | Alta                 |
| 8 a 10 pontos    | Muito alta           |

## ANEXO F

### Inventário de Depressão de Beck (BDI)

#### Grupo 1

- (0) Não me sinto triste.
- (1) Eu me sinto triste.
- (2) Estou sempre triste e não consigo sair disto.
- (3) Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

#### Grupo 2

- (0) Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro.
- (1) Eu me sinto desanimado quanto ao futuro.
- (2) Acho que nada tenho a esperar.
- (3) Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.

#### Grupo

- (0) Não me sinto um fracasso.
- (1) Acho que fracassei mais que uma pessoa comum.
- (2) Quando olho para trás, na minha vida, tudo que posso ver é um monte de fracassos.
- (3) Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.

#### Grupo 4

- (0) Tenho tanto prazer em tudo como antes.
- (1) Não sinto mais prazer nas coisas como antes.
- (2) Não encontro um prazer real em mais nada.
- (3) Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.

#### Grupo 5

- (0) Não me sinto especialmente culpado.
- (1) Eu me sinto culpado grande parte do tempo.
- (2) Eu me sinto culpado na maior parte do tempo.
- (3) Eu me sinto sempre culpado.

#### Grupo 6

- (0) Não acho mais que esteja sendo punido.
- (1) Acho que posso ser punido.
- (2) Creio que vou ser punido.
- (3) Acho que estou sendo punido.

#### Grupo 7

- (0) Não me sinto decepcionado comigo mesmo.
- (1) Estou decepcionado comigo mesmo.
- (2) Estou enjoado de mim.

(3) Eu me odeio.

**Grupo 8**

(0) Não me sinto de qualquer modo pior que os outros.

(1) Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros.

(2) Eu me culpo sempre por minhas falhas.

(3) Eu me culpo por tudo de mal que acontece.

**Grupo 9**

(0) Não tenho quaisquer idéias de me matar.

(1) Eu me sinto triste.

(2) Estou sempre triste e não consigo sair disto.

(3) Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

**Grupo 10**

(0) Não choro mais que o habitual.

(1) Choro mais agora do que costumava.

(2) Agora choro o tempo todo.

(3) Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo mesmo que queira.

**Grupo 11**

(0) Não sou mais irritado agora do que já fui.

(1) Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava.

(2) Agora, eu me sinto irritado o tempo todo.

(3) Não me irrita mais com coisas que costumava me irritar.

**Grupo 12**

(0) Não perdi o interesse pelas outras pessoas.

(1) Estou menos interessada pelas outras pessoas do que costumava estar.

(2) Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas.

(3) Perdi todo o interesse pelas outras pessoas.

**Grupo 13**

(0) Tomo decisões tão bem quanto antes.

(1) Adio as tomadas de decisões mais do que costumava.

(2) Tenho mais dificuldade de tomar decisões do que antes.

(3) Absolutamente não consigo mais tomar decisões.

**Grupo 14**

(0) Não acho, que de qualquer modo, pareço pior do que antes.

(1) Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo.

(2) Acho que há mudanças permanentes na minha aparência que me fazem parecer sem atrativo.

(3) Acredito que pareço feio.

**Grupo 15**

(0) Posso trabalhar tão bem quanto antes.

(1) É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa.



(2) Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa.

(3) Não consigo mais fazer qualquer trabalho.

**Grupo16**

(0) Consigo dormir tão bem como o habitual.

(1) Não durmo tão bem quanto costumava.

(2) Acordo 1 ou 2 horas mais cedo que o habitualmente e acho difícil voltar a dormir.

(3) Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir.

**Grupo17**

(0) Não fico mais cansado do que o habitual.

(1) Fico cansado mais facilmente do que costumava.

(2) Fico cansado ao fazer qualquer coisa.

(3) Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.

**Grupo18**

(0) O meu apetite não está pior do que o habitual.

(1) Meu apetite não é tão bom como costumava ser.

(2) Meu apetite é muito pior agora.

(3) Absolutamente não tenho mais apetite.

**Grupo19**

(0) Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente.

(1) Perdi mais do que dois quilos e meio.

(2) Perdi mais de 5 quilos.

(3) Perdi mais de 7 quilos.

Estou querendo perder peso de propósito comendo menos?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

**Grupo 20**

(0) Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual.

(1) Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição no estômago ou constipação.

(2) Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa.

(3) Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.

**Grupo 21**

(0) Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo.

(1) Estou menos interessada por sexo do que costumava.

(2) Estou muito menos interessado por sexo agora.

(3) Perdi completamente o interesse por sexo.

## ANEXO G

### Dados complementares – Artigo 1

Characteristics of the individuals according to smoking status

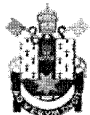
|                       | Total<br>n=1021 | Smoking status |             |             | P                 |
|-----------------------|-----------------|----------------|-------------|-------------|-------------------|
|                       |                 | ns<br>n=636    | cs<br>n=254 | fs<br>n=131 |                   |
| Age in years, mean±SD | 34.8 ±11.3      | 33.9 ±11.1     | 35.8 ±11.5  | 37.4 ±11.3  | 0.001             |
| Gender, n(%)          |                 |                |             |             |                   |
| Male                  | 597 (58.5)      | 361 (56.8)     | 148 (58.3)  | 88 (67.2)   | 0.09              |
| Stable marriage, n(%) |                 |                |             |             |                   |
| Yes                   | 679 (66.6)      | 416 (65.5)     | 173 (68.1)  | 90 (68.7)   | 0.65              |
| Schooling, n(%)       |                 |                |             |             |                   |
| Primary               | 395 (38.7)      | 214 (33.7)     | 119 (46.9)  | 62 (47.3)   | X2<br>(4gl)=21.56 |
| Secondary             | 397 (38.9)      | 257 (40.5)     | 95 (37.4)   | 45 (34.4)   |                   |
| Higher                | 228 (22.4)      | 164 (25.8)     | 40 (15.7)   | 24 (18.3)   |                   |
| BDI                   |                 |                |             |             | F=10.93           |
| BDI scores            | 5.7 ± 6.8       | 5.2 ± 6.5      | 7.4 ± 7.8   | 5.0 ± 5.6   | X2                |
| ≥15                   | 94 (9.2)        | 47 (7.4)       | 38 (15.0)   | 9 (6.9)     | (2gl)=13.43       |

ns: never smokers; cs: current smokers; fm: former smokers

Post-hoc analyses: ns differed from the other two groups on schooling, and from fs on age. cs differed from the other groups on BDI scores.

## ANEXO H

### Aprovação da Comissão do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 237/08-PG

Porto Alegre, 28 de maio de 2008.

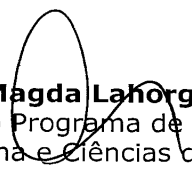
A Pós-Graduanda  
Vanessa Argondizo dos Santos  
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada ""Estudo dos polimorfismos 5ht2c do receptor da serotonina e drd3 do receptor da dopamina, depressão e *status* tabágico"" foi **aprovada** pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,

  
**Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Medicina e Ciências da Saúde

**C/c: Prof. Dr. José Miguel Chatkin**

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3318 - Fax (51) 3320-3316  
E-mail: medicina-pg@pucrs.br  
www.pucrs.br/famed/pos

## ANEXO I

### Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-618/08

Porto Alegre, 17 de julho de 2008.  
21

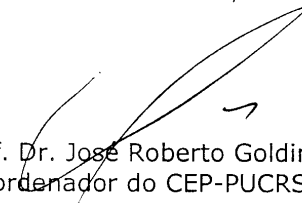
Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 08/04239, intitulado: **“Estudos dos Polimorfismos 5HT2C do receptor da serotonina e DRD3 do receptor da dopamina. Depressão e status tabágico”**.

Salientamos que sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Os relatórios do andamento do protocolo devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Roberto Goldim  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.

Dr. Miguel Chatkin  
N/Universidade

— vauera 93 31 67 63 OK 21/07/08

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)