



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÁRCIA REGINA PIZZO DE CASTRO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENVOLVENDO O
POLIMORFISMO ST_{in}2 VNTR DO GENE TRANSPORTADOR
DE SEROTONINA (*SLC6A4*) EM PACIENTES COM
TRANSTORNO POR USO DE TABACO E TRANSTORNOS
DO HUMOR

Londrina
2014

MÁRCIA REGINA PIZZO DE CASTRO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENVOLVENDO O
POLIMORFISMO STin2 VNTR DO GENE TRANSPORTADOR
DE SEROTONINA (*SLC6A4*) EM PACIENTES COM
TRANSTORNO POR USO DE TABACO E TRANSTORNOS
DO HUMOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Odebrecht Vargas Nunes

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Ehara Watanabe

Londrina

2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C355e Castro, Márcia Regina Pizzo de.
Estudo de associação envolvendo o polimorfismo STin2 VNTR do gene transportador de serotonina (*SLC6A4*) em pacientes com transtorno por uso de tabaco e transtornos do humor / Márcia Regina de Pizzo de Castro. – Londrina, 2014.
119 f. il.

Orientador: Sandra Odebrecht Vargas Nunes.

Coorientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Tabagismo – Teses. 2. Humor (Psicologia) – Teses. 3. Serotonina – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Nunes, Sandra Odebrecht Vargas. II. Watanabe, Maria Angélica Ehara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 613.84:575

MÁRCIA REGINA PIZZO DE CASTRO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENVOLVENDO O POLIMORFISMO
STin2 VNTR DO GENE TRANSPORTADOR DE SEROTONINA
(*SLC6A4*) EM PACIENTES COM TRANSTORNO POR USO DE
TABACO E TRANSTORNOS DO HUMOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sandra Odebrecht Vargas
Nunes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 12 de setembro de 2014.

DEDICO

A Deus, pela vida, pela oportunidade desta existência, por tudo que sou e tenho e por possibilitar a realização deste grande sonho.

Aos meus pais, Tolentino e Rosa, que, por seus exemplos, sempre me ensinaram a amar todas as pessoas, a imprimir amor em tudo, a lutar sempre em busca da concretização de nossos sonhos, com fé inabalável, paciência e resiliência, virtudes que são capazes de transformar vidas e que os têm feito exercer, em plenitude, a função de pais.

Ao Danilo, um filho sempre presente e amigo, que soube me compreender, incentivar e me dar forças para que este sonho se tornasse realidade.

Ao Mário Sérgio, companheiro e amigo, meu grande incentivador, que acreditou no meu sonho e na minha capacidade de vencer os momentos difíceis.

À Prof^ª Dr^ª Sandra Odebrecht Vargas Nunes, minha profunda gratidão e meu carinho, pelo braço amigo, por compartilhar, com sabedoria e generosidade, seus conhecimentos e perseverar comigo nos momentos da construção deste trabalho. Muito obrigada pela sua existência, pelo incentivo, pela credibilidade, pelo ensino e dedicação, que tanto contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e científico.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Minha profunda gratidão e meu carinho

Às Prof^{as} Dr^{as} Maria Angélica Ehara Watanabe, Roberta Losi Guembarovski e Carolina Batista Ariza, pela oportunidade, por acreditarem em mim, por me ensinarem e apoiarem nos momentos difíceis, tornando possível a realização deste estudo e de um grande sonho. Agradeço, também, pela paciência, atenção e contribuição nas análises das amostras e das estatísticas.

Ao Dr. Heber Odebrecht Vargas, grande companheiro e amigo desta jornada, pelo incentivo e dedicação e por fazer parte da construção e realização deste sonho.

Ao Dr. Michael Maes, pela contribuição nas análises estatísticas e pelos valorosos ensinamentos, oportunizando, assim, a concretização deste estudo.

À Prof^a. Dr^a. Edna Maria Vissoci Reiche, pela amizade, dedicação, auxílio e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Estefânia Gastaldello Moreira e ao Prof^o. Dr. Emerson José Venâncio, por fazerem parte da construção deste sonho, pelo auxílio e ensinamentos.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram... mas na intensidade com que acontecem... Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Afonso e Cristina que, mesmo distantes, estiveram ao meu lado, demonstrando apoio e carinho.

Ao Mateus Mendonça Vargas e Ariane Cestari Itimura pelo carinho, pela dedicação, paciência, pelas horas difíceis lembrando-me de que era possível. Pela disposição e pelo companheirismo dispensados durante toda a etapa da realização deste trabalho, muito obrigada.

Ao Luiz Gustavo Piccoli de Melo pelo auxílio, dedicação, amizade e pelo fortalecimento nos momentos difíceis que foram muito importantes para a realização deste sonho.

À equipe da Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade – DASC – pelo auxílio, carinho, compreensão, fatores fundamentais para a concretização deste estudo.

À Prof^ª. Helena Kaminami Morimoto, pelo auxílio e dedicação no Laboratório de Imunologia.

À D. Cecília Odebrecht Vargas pelo carinho, amizade e companheirismo dispensados durante a realização deste estudo.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos.

A toda equipe e a todos pacientes do Ambulatório do Tabagismo e colaboradores da UEL, que viabilizaram este trabalho.

À equipe do Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos de DNA – LEAP DNA da UEL, meu carinho e gratidão pelo auxílio recebido.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pela aprovação de auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível se torna realidade”.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

CASTRO, MRP. **Estudo de Associação envolvendo o Polimorfismo STin2 VNTR do Gene Transportador de Serotonina (*SLC6A4*) em pacientes com Transtorno por Uso de Tabaco e Transtornos do Humor.** 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2014.

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou a associação entre o polimorfismo genético de variáveis números de repetições in tandem (VNTR) no segundo intron, o STin2 VNTR (Serotonin Transporter, Intron 2) do gene transportador de serotonina (SLC6A4) com o transtorno por uso de tabaco (TUT), cessação do tabaco, história tabagística e transtornos do humor. **Método:** Neste estudo caso-controle, foram incluídos 185 indivíduos com TUT (95 depressivos e 90 não depressivos), recrutados do Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo (CRATT), da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e 175 nunca fumantes (62 depressivos e 113 não depressivos), recrutados na mesma instituição. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL. Os diagnósticos de TUT e transtornos do humor foram realizados por entrevista clínica estruturada, na versão clínica (SCID-I), baseada no DSM-IV. Os participantes foram submetidos a um questionário estruturado para avaliar as características sócio-demográficas, clínicas, história familiar e tabagística. Foram utilizados: Teste de Fagerström para Dependência de Nicotina (FTND), Escala de Avaliação para Depressão de Hamilton (HAM-D) e o Teste de Triagem do Envolvimento com Alcool, Tabaco e Outras Substâncias (ASSIST). Foi avaliado o índice de massa corpórea (IMC). A cessação do tabagismo foi avaliada por meio do monóxido de carbono exalado. A genotipagem para determinar o polimorfismo genético STin2 VNTR foi avaliada por meio de PCR alelo-específica (PCR-AS). **Resultados:** Fumantes apresentaram níveis de educação mais baixos, mais desemprego, relacionamentos menos estáveis, mais transtornos do humor e maior risco do uso de álcool e sedativos, comparados aos nunca fumantes. O alelo STin2.12 (OR=2,45, IC 95% 1,44-4,15, $p<0,001$) foi associado com uma chance aumentada, enquanto o genótipo STin2.10/10 (OR=0,42, IC 95% 0,25-0,71, $p<0,001$) foi associado à redução de chance para pacientes com TUT comparados com nunca fumantes. Nos pacientes com TUT não houve associações significativas entre os genótipos e alelos STin2 com a cessação do tabagismo, idade de início, anos de consumo, número de cigarros consumidos por dia e gravidade por uso de tabaco, no entanto, o genótipo STin2.10/10 foi associado a menor número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos. Ao analisar o STin 2 em TUT com e sem transtornos do humor e nunca fumantes com e sem transtornos do humor, verificou-se que o alelo STin2.12 aumenta a chance para comorbidade de TUT com transtornos do humor (OR=3,07, IC 95% 1,41-6,68), enquanto o genótipo homozigoto STin2.10/10 mostra a diminuição de chance (OR=0,34, IC 95% 0,16-0,74). Uma história familiar de TUT foi positivamente associada com TUT em indivíduos sem transtornos do humor. **Conclusões:** Nossos resultados indicam que o genótipo STin2.10/10 está positivamente associado à proteção ao TUT, enquanto o alelo STin2.12 está positivamente associado ao TUT, mas não à resposta ao tratamento ou à gravidade da dependência ou à idade de início do uso de tabaco. Da mesma maneira, o alelo STin2.12 está positivamente associado e o genótipo STin2.10/10 está negativamente associado ao TUT comórbido com transtornos do humor, sugerindo que este polimorfismo pode estar associado a ambos os transtornos.

Palavras-Chave: STin2 VNTR. Transtorno por uso de tabaco. Transtornos do humor. Cessação de fumar. Transportador de serotonina. Polimorfismo genético.

CASTRO, MRP. **Association study involving the STin2 VNTR Polymorphism of the serotonin transporter gene (*SLC6A4*) in patients with Tobacco Use Disorder and Mood Disorders.** 2014. 119 p. Thesis (Doctorate in Health Sciences). Londrina Londrina State University; 2014.

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the association between genetic polymorphism of the variable number *tandem* repeats (VNTR) in the second intron, the STin2 VNTR (*Serotonin Transporter, Intron 2*) of the serotonin transporter gene (*SLC6A4*) and how it might be applicable in people with tobacco use disorder (TUD), tobacco use cessation, smoking history and mood disorders. **Method:** In this case-control study, 185 individuals with TUD (95 depressed and 90 non-depressed), recruited from the outpatients at the Reference Center of Approach and Treatment for Smokers (CRATT), at the Londrina State University (UEL), and 175 never-smokers (62 depressed and 113 non-depressed), was recruited from the same institution. The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects at UEL. The diagnoses of TUD and mood disorders were performed by structured clinical interview, clinical version (SCID-I) based on the DSM-IV. Participants underwent a structured interview to assess the socio-demographic, clinical, family and smoking history. The Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND), Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) and the Alcohol Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST) were used. The body mass index (BMI) was evaluated. Smoking cessation was assessed by exhaled carbon monoxide. Genotyping for determining STin2 VNTR polymorphism was assessed by allele-specific PCR (AS-PCR). **Results:** Smokers had lower levels of education, were more frequently unemployment, had less stable relationships, more mood disorders and a higher risk of using alcohol and sedatives compared to the never-smokers group. The STin2.12 allele (OR=2.45, 95% CI 1.44-4.15, $p<0.001$) was associated with an increased chance of TUD while genotype STin2.10/10 (OR=0.42, 95% CI 0.25-0.71, $p<0.001$) was associated with a reduced chance for patients with TUD compared to never-smokers. For patients with TUD there were no significant associations between the genotypes and STin2 alleles and with cessation smoking, age at onset, years smoked, number of cigarettes smoked per day and seriousness of tobacco use. However, the STin2.10/10 genotype was associated with a lower number of cigarettes smoked per day over the years. By analyzing the STin2 in TUD with and without mood disorders and never-smokers with and without mood disorders, it was found that the STin2.12 allele increases the chance for TUD comorbidity with mood disorders (OR=3.07, 95% CI 1.41-6.68), while the homozygous STin2.10/10 shows a decreased of chance (OR=0.34, 95% CI 0.16-0.74). A family history was positively associated with TUD in subjects without mood disorders. **Conclusions:** Our results indicate that genotype STin2.10/10 is positively associated to protection TUD, while the STin2.12 allele is positively associated with TUD, but not the response to treatment or the severity of dependence or the age of onset of tobacco use. Likewise, the STin2.12 allele is positively associated and genotype STin2.10/10 is negatively associated with TUD comorbid with mood disorders, suggesting that this polymorphism can be associated with both disorders.

Keywords: STin2 VNTR. Tobacco use disorder. Mood disorders. Smoking cessation. Serotonin transporter. Genetic polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
APA	Associação Americana de Psiquiatria
ASSIST	<i>Alcohol Smoking and Substance Involvement Screening Test</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	<i>Confidence Interval</i>
CNES	Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde
COex	Monóxido de Carbono no Ar Exalado
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CRATT	Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo
DASC	Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade da UEL
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais – 4ª edição
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais – 5ª edição
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Dietilenoaminotetraacetato Dissódico
FTND	Teste de Fagerström para Dependência de Nicotina
FTQ	<i>Fagerström Tolerance Questionnaire</i>
GABA	<i>Gamma-AminoButyricAcid</i>
HAM-D	Escala de avaliação para Depressão de Hamilton
HDRS	<i>Hamilton Depression Rating Scale</i>
HPA	Hipotálamo- Hipófise- Adrenal
HRL	Hemocentro Regional de Londrina
HUL	Hospital Universitário de Londrina
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LEAP DNA	Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos de DNA
MAO	Monoaminoxidase
MS	Ministério da Saúde

OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PNCT	Programa Nacional de Controle do Tabagismo
PPM	Partes por Milhão
SAS	Secretaria de Atenção à Saúde
SCID-I	Entrevista Clínica Estruturada, baseada na Versão Clínica do DSM-IV, Eixo I
SERT	<i>Serotonin Transporter</i>
SLC6	<i>Solute Carrier Family 6 (neurotransmitter transporter)</i>
SLC6A4	Solute Carrier Family 6 (neurotransmitter transporter), member 4
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
STin2 VNTR	<i>Serotonin Transporter, Intron 2</i>
STin2. 9	Alelo de 9 Repetições do STin2 VNTR
STin2. 10	Alelo de 10 Repetições do STin2 VNTR
STin2. 12	Alelo de 12 Repetições do STin2 VNTR
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRN	Terapia de Reposição de Nicotina
TUD	<i>Tobacco Use Disorder</i>
TUT	Transtorno por Uso de Tabaco
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
3`UTR	<i>Three prime untranslated region</i>
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HTT	<i>Serotonin transporter</i>
5-HTTLPR	<i>Serotonin-transporter-linked Polymorphic Region</i>
5-HTTVNTR2	<i>Serotonin Transporter Variable Number of Tandem Repeat in Intron 2</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	TRANSTORNOS POR USO DE TABACO	16
2.2	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA O TUT	19
2.3	COMORBIDADES DO TUT E TRANSTORNOS DO HUMOR	21
2.4	CAMINHOS NEUROBIOLÓGICOS COMUNS ENVOLVENDO A COMORBIDADE DE TUT E TRANSTORNOS DO HUMOR	23
2.5	GENE PARA O TRANSPORTADOR DA SEROTONINA	25
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	31
4.2	LOCAL DO ESTUDO	31
4.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA	31
4.4	PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS	32
4.4.1	Coleta de Dados	33
4.4.2	Instrumentos Para a Coleta de Dados	33
4.4.2.1	<i>Caracterização Sócio-demográfica, Situação de Trabalho, Clínica e Hábito Tabagístico dos Participantes</i>	33
4.4.2.2	<i>Teste de Triagem do Envolvimento com Álcool, Tabaco e Outras Substâncias (ASSIST versão 3.0)</i>	34
4.4.2.3	<i>Avaliação do Diagnóstico dos Transtornos do Humor</i>	34
4.4.2.4	<i>Avaliação da Gravidade da Depressão</i>	35
4.4.2.5	<i>Teste de Fagerström para Dependência de Nicotina (FTND)</i>	35
4.4.2.6	<i>Índice de Massa Corpórea (IMC)</i>	36
4.4.2.7	<i>Número de Cigarros Consumidos ao Longo dos Anos (Anos/ Maço)</i>	36
4.4.2.8	<i>História Familiar</i>	36
4.4.2.9	<i>Análise do Monóxido de Carbono Exalado</i>	36

4.4.2.10	<i>Coleta da Amostra e Análise Molecular</i>	36
4.4.2.11	<i>Obtenção do DNA Genômico</i>	37
4.4.2.12	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	37
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	ARTIGO 1 – SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associate with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study	41
5.2	ARTIGO 2- STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders	50
6	CONCLUSÕES	83
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICES	101
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	102
	APÊNDICE B - Questionário	103
	ANEXOS	118
	ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - CEP-UEL 037/2011.....	119

1 INTRODUÇÃO

*“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos de que as grandes proezas da
história foram conquistadas do que parecia impossível.”*

(Charles Chaplin)

O transtorno por uso de tabaco (TUT) é uma das principais causas de mortalidade e faz com que ocorra uma em cada dez mortes de adultos em todo o mundo. No Brasil, a prevalência do uso de tabaco, em ambos os sexos, é estimada em 16,2% da população ⁽¹⁾. Em uma área metropolitana da Região Sul do Brasil, na cidade de Londrina, Paraná, a prevalência de TUT foi estimada em 32% ⁽²⁾. A mortalidade atribuída ao TUT em países em desenvolvimento é de cerca de 62% na faixa etária entre 30 e 69 anos ⁽³⁾.

O TUT apresenta alta comorbidade com transtornos do humor o que agrava o curso clínico de ambos os transtornos. Além disso, aumenta o risco para os transtornos do humor, bem como estes ampliam o risco para TUT. Ambos os transtornos têm etiologias subjacentes comuns, genéticas e ambientais ⁽⁴⁾.

A comorbidade entre transtornos depressivos e TUT em pacientes do Centro de Tratamento para Cessação do Tabaco é alta. Em um estudo com 167 fumantes que buscaram tratamento no Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo (CRATT), localizado no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e com 272, nunca fumantes, que procuraram, voluntariamente, o Hemocentro Regional de Londrina (HRL) para doação de sangue, verificou-se que 50% dos fumantes eram depressivos e que, estatisticamente, havia mais depressão entre fumantes do que entre pessoas que nunca fumaram ⁽⁵⁾. Outros estudos em Centro de Referência para Tratamento de Tabagismo também confirmam a comorbidade entre TUT, transtornos depressivos e história de tentativa de suicídio ⁽⁶⁻¹¹⁾.

A comorbidade entre transtornos do humor e TUT pode ser explicada por várias teorias. A primeira é a da automedicação, que supõe que os transtornos depressivos levam ao TUT, porque a nicotina e/ou outros ingredientes da fumaça do tabaco têm efeitos antidepressivos. A segunda sustenta que o TUT e os transtornos

depressivos têm um risco ambiental ou genético comuns. A terceira teoria descreve que os transtornos depressivos são sequela de uma disfunção cerebral decorrente do TUT (12).

Vários estudos documentaram a relação entre os transtornos depressivos e o consumo de tabaco (13-25). Trabalhos semelhantes relataram que o TUT está associado a um risco de comportamento suicida e de transtornos depressivos (8,26-30).

A comorbidade entre transtornos do humor (transtornos depressivos ou transtorno bipolar) e TUT pode estar relacionada a fatores genéticos e ambientais. Vários estudos têm relacionado a suscetibilidade genética entre a comorbidade do TUT e os transtornos depressivos com o gene transportador de serotonina (*SLC6A4*) (31,32). O gene *SLC6A4* é também referido como transportador da serotonina (5-HTT ou SERT) e possui uma ação central na regulação da função sináptica serotoninérgica por recaptação da serotonina da fenda sináptica para o neurônio (33).

O gene *SLC6A4* tem sido pesquisado também em relação a suscetibilidade genética para os transtornos depressivos associados ao estresse precoce de vida (34-36) e também foram encontrados alguns estudos de revisão sistemática e de associação envolvendo o gene *SLC6A4* com TUT (37-53).

A atividade transcricional do gene *SLC6A4* humano é modulada por diversas variantes genéticas. Os polimorfismos mais estudados descritos no gene até a presente data incluem: uma inserção/deleção na sua região promotora, chamada 5-HTTLPR (*Serotonin Transporter Linked Polymorphic Region*) (54); Variáveis Números de Repetições *in tandem* (VNTR) no segundo intron, o STin2 VNTR (*Serotonin Transporter, Intron 2*) (55,56), e um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) de troca de G/T em uma região 3'UTR não codificadora (57).

Os dois polimorfismos do gene *SLC6A4* mais estudados em modular a suscetibilidade a transtornos de ansiedade e do humor e, também, transtornos de abuso de substâncias como o TUT são o 5-HTTLPR e o STin2 VNTR (58). Embora a grande maioria dos estudos de TUT e transtornos depressivos estejam relacionados na região polimórfica do promotor 5-HTTLPR, existem outros trabalhos que indicam que polimorfismos STin2 VNTR têm um papel importante no transtorno depressivo (59,60), em TUT (42,52), e em indivíduos com história de comportamento suicida (61). Encontram-se, no entanto, poucos estudos sobre polimorfismos STin2 VNTR em TUT com comorbidade com transtornos do humor.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a associação do polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* em fumantes com e sem transtornos do humor, e nunca fumantes com e sem transtornos do humor, para saber se o mesmo está associado ao TUT, aos transtornos do humor, ou a ambas comorbidades. Também foi avaliada a associação do gene *SLC6A4* com a história tabagística em pacientes com TUT, como a gravidade da dependência de nicotina, número de cigarros consumidos por dia, idade de início do uso de tabaco, número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos, história familiar de TUT, tentativa de cessação do tabaco e cessação do tabagismo.

O polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* possivelmente é um alvo para a compreensão da comorbidade entre TUT e transtornos do humor. Há um estudo de associação do polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* em TUT recrutados em pacientes com câncer bucal na população brasileira ⁽⁵²⁾. Até o momento atual, este é primeiro estudo descrito sobre polimorfismos STin2 VNTR em pacientes com TUT recrutados de um Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo com comorbidade com transtornos do humor na população brasileira.

Os polimorfismos genéticos, poderão contribuir para o maior entendimento dos caminhos neurobiológicos comuns envolvendo a comorbidade de TUT e transtornos do humor podendo contribuir para novas estratégias de tratamentos adjuvantes em transtornos do humor e em TUT.

Considerando que os indivíduos portadores do TUT que buscam tratamento em Centros de Referência de Tratamento do Tabagismo têm alta comorbidade com transtornos do humor e que alterações serotoninérgicas estão presentes nestes indivíduos, as seguintes hipóteses foram consideradas:

- A. O polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* pode estar associado ao TUT, aos transtornos do humor ou a ambas comorbidades.
- B. O polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* pode estar associado à cessação do tabagismo, idade de início do uso de tabaco, gravidade da dependência de nicotina, número de cigarros consumidos por dia, número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos e história familiar de TUT.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

*"Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra,
no trabalho, na ação- reflexão.
A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.
E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura,
fora da boniteza e da alegria."*

(Paulo Freire)

2.1 TRANSTORNOS POR USO DE TABACO

O TUT é uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo mundo ⁽³⁾. Fumar cigarros é um dos mais potentes e prevalentes hábitos aditivos, que influenciam o comportamento do ser humano e está associado à alta prevalência de doenças relacionadas ao tabaco, tais como: doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer, decorrente de um processo inflamatório crônico ⁽⁶²⁾. Fumantes com graves transtornos mentais têm um risco aumentado para câncer, doenças pulmonares e cardiovasculares e eles morrem em média 25 anos mais cedo ⁽⁶³⁾. A mortalidade por doenças relacionadas ao tabaco é de cerca de 53% em esquizofrenia, de 50% em transtornos depressivos e de 48% em transtornos bipolares ⁽⁶⁴⁾.

A prevalência de fumantes no mundo é de 1,3 bilhão. No Brasil, há 27,9 milhões de fumantes, consumindo 110 bilhões de cigarros por ano. Estima-se que, em todo o mundo, por ano, ocorram cinco milhões de mortes relacionadas ao hábito de fumar, sendo este o responsável por 10 mil mortes por dia, ou seja, uma pessoa a cada seis segundos, e o redutor da expectativa de vida em 15 anos. No Brasil, ocorrem 200 mil óbitos por ano associados ao hábito de fumar ⁽¹⁾.

O TUT é um comportamento complexo influenciado tanto por fatores genéticos e ambientais ^(65,66) quanto por individuais, como o desenvolvimento neurológico e concomitância com eventuais doenças mentais ⁽⁶⁷⁾. Em relação à interação entre a influência genética e ambiental sobre a etiologia da dependência de nicotina, os estudos com gêmeos revelaram que 50% do risco de dependência de nicotina são geneticamente transmitidos ⁽⁶⁸⁾.

Os estudos que avaliaram as questões genética, ambiental, fatores individuais e suas inter-relações apontam para o fato de que a contribuição genética pode ter papel significativo no TUT, sendo possivelmente responsável por 40% a 60% da variabilidade do risco da idade de início do uso. A manutenção da dependência de nicotina parece ter uma contribuição da hereditariedade de cerca de 70%, enquanto influências ambientais parecem ser menos significantes ^(69,70). A hereditariedade de TUT é estimada entre 37% e 56% para iniciação do uso de tabaco e de 59% a 70% para desenvolver a dependência de nicotina ^(71,72). Fatores ambientais, tais como família, pais e cultura certamente contribuem na suscetibilidade para o comportamento de fumar ⁽⁷³⁾, o qual é dividido em vários estágios: início, uso regular, dependência, cessação e recaídas. Nos transtornos do humor, a hereditariedade também é alta. Estima-se que, no transtorno bipolar, ela seja cerca de 75% a 85% ⁽⁷⁴⁾ e, nos transtornos depressivos unipolar, é de cerca de 40% ⁽⁷⁵⁾.

O TUT é um comportamento complexo que inclui o risco poligênico e várias regiões do genoma têm sido estudadas na suscetibilidade para a iniciação do TUT, no grau de dependência, na dificuldade de cessação e na manutenção da abstinência ⁽⁷⁶⁾.

A cessação do tabagismo é um processo dinâmico que envolve uma sequência de várias tentativas não bem sucedidas até conseguir uma abstinência prolongada. A maioria dos fumantes realiza de três a dez tentativas até obter a abstinência definitiva ⁽⁷⁷⁾. Indivíduos com TUT e transtornos depressivos têm maior risco de não cessar o consumo do tabaco que os fumantes não depressivos ⁽¹⁵⁾. Mais de 80% dos indivíduos que apresentam TUT tentam parar em algum momento; 60% apresentam recaídas em uma semana e menos do que 5% permanecem abstinentes por longos períodos ⁽⁷⁵⁾. Três classes de medicamentos são consideradas de primeira linha para cessação do TUT: adesivo de nicotina, bupropiona e vareniclina ⁽⁷⁸⁾. Outras abordagens de cessação do tabagismo, associadas ao tratamento farmacológico, incluem aconselhamento e psicoterapias. Estes tratamentos combinados apresentam as taxas de cessação do tabagismo entre 20% a 30%, em um ano de tratamento ⁽⁷⁹⁾. Cerca de 68,8% dos fumantes adultos querem parar de fumar. Destes, 52,4% fizeram uma tentativa de parar, 6,2% tentaram recentemente, 48,3% foram aconselhados por um profissional de saúde para parar de fumar e 31,7% utilizaram aconselhamento e/ou medicamentos,

quando tentaram cessar o consumo do tabaco ⁽⁸⁰⁾. Os indivíduos com TUT com transtornos depressivos tratados com antidepressivo e psicoterapias têm taxas de abstinência cerca de 29% em tratamentos prolongados, mas apresentam maiores chances de recaídas ⁽⁷⁹⁾.

As baixas taxas de sucesso de cessação de fumar em programas de tratamento podem estar relacionadas a traços de personalidade, comorbidade com transtornos mentais e suscetibilidade genética. Polimorfismo do gene *SLC6A4* tem sido relacionado à dificuldade de cessar de fumar quando associada a traços de personalidade ansiosa e a emoções, tais como depressão e ansiedade ⁽⁴⁰⁾.

Um estudo avaliou o risco genético em polimorfismos SNPs e o desenvolvimento da progressão do comportamento de fumar desde a iniciação, a manutenção, a progressão para dependência de nicotina e a cessação do tabagismo. Verificou-se alto risco genético na progressão para dependência de nicotina, mas não na iniciação. Tabagistas com maior risco genético fumam mais que vinte cigarros diários e têm menor sucesso na cessação do tabagismo ⁽⁷⁶⁾.

O gene *SLC6A4* pode ser associado com o TUT comórbido com transtornos psiquiátricos e traços de personalidade decorrentes do sistema serotoninérgico modular afeto, cognição e processos comportamentais. O gene *SLC6A4* pode modular a suscetibilidade a vários transtornos mentais incluindo: traços de personalidade ansiosa, transtornos de ansiedade, transtornos psicossomáticos, transtornos do humor, suicídio, transtornos relacionados ao uso de substâncias (transtorno relacionado ao álcool, TUT), transtornos alimentares, transtorno por déficit de atenção e hiperatividade, autismo, esquizofrenia, doença de Alzheimer e doença de Parkinson ⁽⁵⁸⁾.

Foram encontrados alguns estudos de revisão sistemática e de associação envolvendo o gene do transportador de serotonina com o comportamento de fumar, relacionados aos polimorfismos na região promotora 5-HTTLPR e o STin2 VNTR. ⁽³⁷⁻⁵³⁾.

2.2 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA O TUT

Os transtornos relacionados à nicotina ou dependência de nicotina descrita na quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM-IV⁽⁸¹⁾, são agora chamados, na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM-5 de transtornos relacionados ao tabaco que incluem o TUT, a abstinência de tabaco, outros transtornos induzidos pelo tabaco, como transtornos do sono e transtornos inespecíficos relacionados ao tabaco⁽⁷⁵⁾.

Os critérios diagnósticos do DSM-IV e DSM-5 consideram que tanto o tabaco como a nicotina levam à dependência e apresentam sintomas de abstinência que podem desenvolver-se após o último cigarro, alcançando um pico nas primeiras 24 e 48 horas e podendo durar, por semanas ou meses. Os sintomas incluem intensa avidez pela substância, irritabilidade, dificuldades para concentrar-se, sonolência e problemas com o sono, maior apetite e ganho de peso, redução do desempenho motor e maior tensão muscular.

No DSM-5, os critérios diagnósticos para o TUT são os seguintes: um problemático uso de tabaco causando prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por pelo menos dois dos 11 critérios possíveis, presentes em um período de 12 meses:

1. Uso do tabaco em quantidades crescentes ou em períodos de tempo mais longos.
2. Desejo persistente ou esforços mal sucedidos no controle de uso do tabaco.
3. Significativo gasto de tempo em atividades necessárias para obter ou usar tabaco.
4. Fissura, forte desejo ou urgência para fazer uso do tabaco.
5. Uso recorrente do tabaco resultando em falha no cumprimento de obrigações importantes em trabalho, escola ou ambiente doméstico.
6. Uso contínuo do tabaco, apesar de obter persistentes ou recorrentes problemas sociais ou interpessoais, causados ou exacerbados pelos efeitos do tabaco.

7. Abandono ou redução de importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas devido ao uso do tabaco.
8. Uso recorrente do tabaco em situações onde é fisicamente arriscado (ex.: fumar na cama).
9. Uso continuado do tabaco, apesar do conhecimento sobre possuir problema físico ou psicológico, persistente ou recorrente, causado ou exacerbado pelo tabaco.
10. Tolerância, definida por um dos seguintes critérios:
 - A. Necessidade de aumento significativo das quantidades de tabaco para atingir o efeito desejado.
 - B. Redução significativa do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de tabaco.
11. Abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes critérios:
 - A.- A síndrome de abstinência típica do tabaco.
 - B.- O uso do tabaco (ou de substância correlata, como nicotina) para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.

A síndrome de abstinência de nicotina ou tabaco é caracterizada tipicamente pelos seguintes critérios: ^(75,81).

A.- Uso diário de nicotina ou tabaco por, pelo menos, algumas semanas.

B.- Cessaçãõ abrupta do uso de nicotina ou tabaco, ou redução na quantidade do uso de nicotina ou de tabaco, seguidos, dentro de 24 horas (ou mais), por quatro (ou mais) dos seguintes sintomas:

- 1- Irritabilidade, frustraçãõ ou raiva;
- 2- Ansiedade;
- 3- Dificuldade de concentraçãõ;
- 4- Aumento do apetite;
- 5- Inquietaçãõ;
- 6- Humor deprimido;
- 7- Insônia.

C- Os sinais ou sintomas no Critério B causam sofrimento clinicamente significativo ou comprometimento no funcionamento social, ocupacional ou em outras áreas de funcionamento importantes.

D- Os sinais ou sintomas não levam a uma condição médica geral e nem são melhor explicados por outro transtorno mental.

Estes sintomas têm um pico nos primeiros dias e tendem a desaparecer dentro de um mês.

2.3 COMORBIDADES DO TUT E TRANSTORNOS DO HUMOR

A Organização Mundial da Saúde (OMS), na décima revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), inseriu os transtornos mentais e de comportamentos decorrentes do uso de tabaco (F 17.2) e o uso do tabaco como problema relacionado ao estilo de vida (Z 72.0) ⁽⁸²⁾.

Os transtornos do humor (afetivos) são classificados nas diretrizes diagnósticas da Organização Mundial de Saúde como F30 (episódio maníaco), F31 (transtorno afetivo bipolar), F32 (episódio depressivo), F33 (transtorno depressivo recorrente), F34 (transtorno persistente do humor), F38 (outro transtorno do humor), F39 (transtorno do humor não especificado) ⁽⁸²⁾, considerada uma doença extremamente grave, levando a risco de cronicidade, incapacidade progressiva e morte prematura ⁽⁸³⁾. No DSM-IV ⁽⁸¹⁾, relata-se que os dois principais transtornos do humor são os transtornos depressivos e os transtornos bipolares. Na versão do DSM-5, diferenciam-se os transtornos depressivos do transtorno bipolar e transtornos relacionados que incluem um grupo amplo de enfermidades, nas quais, destacam-se os transtornos bipolares I e II, que, nos Estados Unidos, apresentam uma prevalência em doze meses estimada de 0,6% e 0,8%, respectivamente, e transtorno depressivo maior com uma prevalência em um ano, estimada em 7% ⁽⁷⁵⁾.

Associados às altas prevalências, os transtornos depressivos são caracterizados por altas taxas de recorrências, evolução crônica e incapacidade ⁽⁸⁴⁾, o que gera, além de sofrimento, altos custos econômicos e sociais para os governos, devido aos gastos com tratamentos para a população e às perdas de produtividade ⁽⁸⁵⁾.

A comorbidade - também conhecida como diagnóstico duplo - é o diagnóstico de dois ou mais transtornos em um único paciente. As comorbidades clínicas mais comuns que envolvem o TUT são as doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer. As comorbidades de transtornos mentais mais comuns

associadas com TUT são uso de álcool, uso de outras substâncias psicoativas, depressão, transtorno bipolar, ansiedade, transtorno de personalidade, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Indivíduos portadores de TUT apresentam comorbidade com transtorno mental que variam de 22% a 32%. Fumantes dependentes de nicotina apresentam de 2,7 a 8,1 maior probabilidade de terem estes transtornos do que fumantes não dependentes de nicotina, nunca fumantes ou ex-fumantes ⁽⁷⁵⁾.

Em pacientes com transtornos psiquiátricos ou com abuso de substâncias, em comparação com a população em geral, a probabilidade de se diagnosticar o TUT é de duas a quatro vezes maiores. No transtorno depressivo maior, a prevalência de TUT pode chegar de 40% a 60% e no transtorno bipolar de 50% a 65% ⁽⁸⁶⁾. A comorbidade entre TUT e transtornos depressivos é alta. Cerca de 30% dos pacientes com depressão são fumantes diários, cerca de 60% de fumantes atuais ou que fumaram no passado apresentam história de depressão, comparados com 39% dos fumantes sem depressão. Fumantes dependentes da nicotina são duas vezes mais propensos que os não fumantes para terem um histórico de depressão ⁽¹⁴⁾. A prevalência de comorbidade é maior entre depressão e TUT: cerca de 64% em Centro de Referência de Tratamento para cessação do tabaco ^(5,7,18).

Em um estudo em Centro de Referência de Abordagem e Tratamento para cessação do tabagismo, observou-se que fumantes deprimidos do sexo masculino utilizaram mais cigarros por dia, apresentaram maior consumo de álcool, níveis mais baixos de colesterol de alta densidade (HDL), níveis mais elevados de fator de necrose tumoral (TNF- α) comparados aos fumantes não deprimidos. Mulheres fumantes deprimidas apresentaram maior preocupação com ganho de peso do que mulheres fumantes não deprimidas. A cessação do tabagismo em 52 semanas não encontrou diferenças entre os sexos ou em terem quadros depressivos, pois, neste Centro de Tratamento de cessação do tabagismo, eram utilizados antidepressivo bupropiona e psicoterapia⁽⁷⁾. A patofisiologia de ambas as doenças TUT e transtornos do humor incluem alterações de neurotransmissores, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, aumento de citocinas inflamatórias e das proteínas de fase aguda, ativação da micróglia, disfunção mitocondrial, aumento do estresse oxidativo e nítrico e o decréscimo dos níveis de antioxidante, o que gera danos de lipídeos, proteína e no DNA com consequente modificação da função do

gene ⁽⁸⁾. Fumantes deprimidos que não fazem tratamento em Centro de Referência de cessação do tabagismo têm piores taxas de cessação de fumar do que os fumantes não deprimidos ⁽¹⁵⁾.

Muitos estudos têm relatado sobre a comorbidade entre transtornos do humor e TUT ⁽¹³⁻²⁵⁾. A comorbidade entre TUT e transtorno do humor pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos comuns, ou pode ser uma consequência de interações entre variantes genéticas e ambientais (efeitos tóxicos da fumaça de cigarro). Dados apoiam a visão de que a suscetibilidade genética comum pode explicar, em parte, a relação entre depressão e TUT ^(32, 87-89). Da mesma forma, a comorbidade entre ambos os transtornos pode ser determinada, pelo menos em parte, por fatores genéticos e ambientais ⁽³²⁾. O TUT está associado a um risco aumentado de transtornos depressivos, incluindo conduta suicida ^(5,6,9,10,26-29).

2.4 CAMINHOS NEUROBIOLÓGICOS COMUNS ENVOLVENDO A COMORBIDADE DE TUT E TRANSTORNOS DO HUMOR

A exposição crônica de nicotina resulta em neuroadaptação, que é o desenvolvimento de tolerância e está associada a um aumento do número de receptores colinérgicos nicotínicos do cérebro. Também resulta em mudanças na expressão gênica e síntese protéica, com geração de novas conexões sinápticas, análoga a outras formas de aprendizado. A ativação de receptores colinérgicos nicotínicos promove a liberação de uma variedade de neurotransmissores, modulando vários comportamentos em fumantes, como a dopamina relacionada ao prazer, a supressão do apetite, a noradrenalina relacionada ao alerta e à supressão do apetite, a acetilcolina relacionada à excitação e melhora cognitiva, o glutamato relacionado ao aprendizado e melhora na memória, a serotonina relacionada com a modulação do humor e supressão do apetite, a β -endorfina e a GABA (ácido γ -aminobutírico) relacionados à redução de ansiedade e tensão. Quando uma pessoa para de fumar, a ausência de nicotina resulta na alteração de neurotransmissores e comportamentos relacionados ⁽⁹⁰⁾.

A comorbidade entre TUT e transtornos depressivos estaria relacionada a ações dos neurotransmissores dopamina, a serotonina, o glutamato e a GABA ⁽⁹⁰⁾. A

coocorrência de transtornos depressivos e TUT pode estar associado com a deficiência da função da serotonina em pacientes deprimidos fumantes ⁽²⁶⁾.

A estimulação crônica pela nicotina resulta em neuroadaptação, decorrente da ativação, pela nicotina, dos receptores nicotínicos pós-sinápticos $\alpha 4\beta 2$ e provoca a liberação de dopamina no *nucleus accumbens*. Além disso, a nicotina liga-se aos receptores nicotínicos pré-sinápticos $\alpha 7$ nos neurônios glutamatérgicos o que leva à liberação de glutamato e de dopamina no *nucleus accumbens*. A nicotina, por meio dos receptores pós-sinápticos $\alpha 4\beta 2$, também dessensibiliza os interneurônios GABAérgicos inibitórios na área tegumentar ventral. A redução da neurotransmissão GABAérgica desinibe os neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, que também estimula a liberação de dopamina no *nucleus accumbens* ⁽⁹¹⁾.

A serotonina está envolvida no comportamento de fumar, porque a nicotina aumenta a serotonina no cérebro e, na abstinência, reduz os níveis de serotonina. Isto está relacionado à manutenção de comportamentos de recompensa ^(38,46). A atividade da monoaminoxidase (MAO) no sistema nervoso central (SNC) pode estar diminuída em fumantes de cigarros, e esta atividade modifica a regulação de neurotransmissores no sistema serotoninérgico e noradrenérgico relacionados com afetos (depressão e ansiedade), o comportamento, o movimento, a memória, o apetite, o sono e a personalidade ⁽⁹²⁾. Diferenças genéticas podem ser parcialmente responsáveis por diferenças biológicas que reforçam o comportamento de fumar. A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é uma indolamina, cujo aminoácido precursor é o L-triptofano e a enzima chave envolvida no metabolismo da serotonina é a MAO ⁽⁹¹⁾.

Alterações na neurotransmissão da serotonina são evidentes em pacientes com transtornos do humor, tanto em depressão unipolar como em depressão bipolar ^(58,93). O gene do 5-HTT pode modular a suscetibilidade para os transtornos do humor (depressão unipolar como depressão bipolar), bem como transtornos relacionados ao uso de substâncias psicoativas, incluindo TUT ⁽⁵⁸⁾. Vários caminhos comuns genéticos e ambientais estão envolvidos em TUT e transtornos do humor. Variantes do gene que codifica o 5-HTT estão associados com a suscetibilidade de desenvolver transtorno afetivo quando expostos a vários fatores de estresse da vida ⁽⁹¹⁾.

A comorbidade entre transtornos por uso de substâncias com transtornos depressivos tem sido relacionada a fatores de suscetibilidade genética e ambientais,

tais como influência familiar e social, história de fatores genéticos familiares, diferenças individuais de resposta para o início do uso de substâncias, traços específicos de personalidade, trauma de vida precoce e funções executivas frontais. As alterações comuns entre transtornos depressivos e transtorno por uso de substâncias estão relacionadas com o fator de liberação corticotrófico (CRF), alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), alterações de catecolaminas, serotonina, GABA, glutamato e atividade de MAO. Inibindo a MAO, o cigarro exerce um efeito antidepressivo, e isto pode contribuir para as altas taxas de TUT em depressivos ⁽⁹⁴⁾.

Os fatores genéticos comuns entre transtornos do humor e TUT estão relacionados com três candidatos de genes: 1) catecol-O metiltransferase (COMT), 2) transportador da dopamina (*SLC6A3*) e o transportador da serotonina (*SLC6A4*) ^(4,95). O gene *SLC6A4* está relacionado ao TUT, transtornos depressivos e transtorno de ansiedade ⁽⁶⁷⁾.

2. 5 GENE PARA O TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

O gene codificador do 5-HTT foi identificado como *SLC6A4* de 31 kb contendo 14 exons, estando localizado no cromossomo 17, mais especificamente na região 17q11.1- q12 ^(55,56).

Um polimorfismo é uma variação genética em um segmento de DNA que ocorre em uma população com uma frequência maior que 1%, resultando na existência de pelo menos dois alelos. Os alelos podem alterar a expressão ou a atividade de um dado gene. Polimorfismos na região codificadora e reguladora do gene *SLC6A4* podem alterar a neurotransmissão.

Foi identificado, há quase vinte anos, um polimorfismo na região promotora do gene *SLC6A4*, denominado de 5-HTTLPR (*serotonin-transporter-gene-linked polymorphic region*): uma deleção de 44 pares de bases que gera dois alelos – um alelo curto (S, do inglês *short*), com menor expressão do transportador e, conseqüentemente menor receptação da serotonina na fenda sináptica que o alelo longo (L, do inglês *long*) ⁽⁵⁴⁾.

Embora a maioria dos estudos tenha considerado esse polimorfismo bialélico ⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾, foram identificados alelos incomuns, maiores que a variante longa, e

denominados de extra longo (XL, do inglês *extra-long*) e um de comprimento intermediário entre os alelos L e XL, denominado de muito longo (VL, do inglês *very long*)^(99,100).

A maioria dos estudos demonstra associação entre o polimorfismo 5-HTTLPR e a dependência do álcool, mas a associação com alelos específicos ainda é inconsistente, dependendo do tipo de álcool consumido, do tipo de comportamento do consumidor do álcool e também da idade de início do consumo⁽¹⁰¹⁾. Sabe-se ainda que esse polimorfismo foi associado à suscetibilidade aumentada ao uso de drogas psicotrópicas ilegais por adolescentes⁽¹⁰²⁾, e ao hábito tabagista.

Outro polimorfismo bastante estudado no gene *SLC6A4* é denominado de 5-HTTVNTR2 ou STin2 VNTR. Localizado no segundo íntron, consiste na presença de variáveis números de repetições em *tandem* (9, 10 ou 12 repetições) de 17 pares de bases. Da mesma maneira que o 5-HTTLPR, o STin2 VNTR possui uma atividade transcricional dependente de alelo⁽¹⁰³⁾.

Existem evidências crescentes de que a informação genética será uma ferramenta útil na escolha do tratamento de pacientes com transtornos por uso de substâncias, assim que testes se tornarem mais comuns na prática da medicina⁽¹⁰⁴⁾. A figura 1 mostra a representação dos principais polimorfismos descritos na literatura para o gene *SLC6A4*.

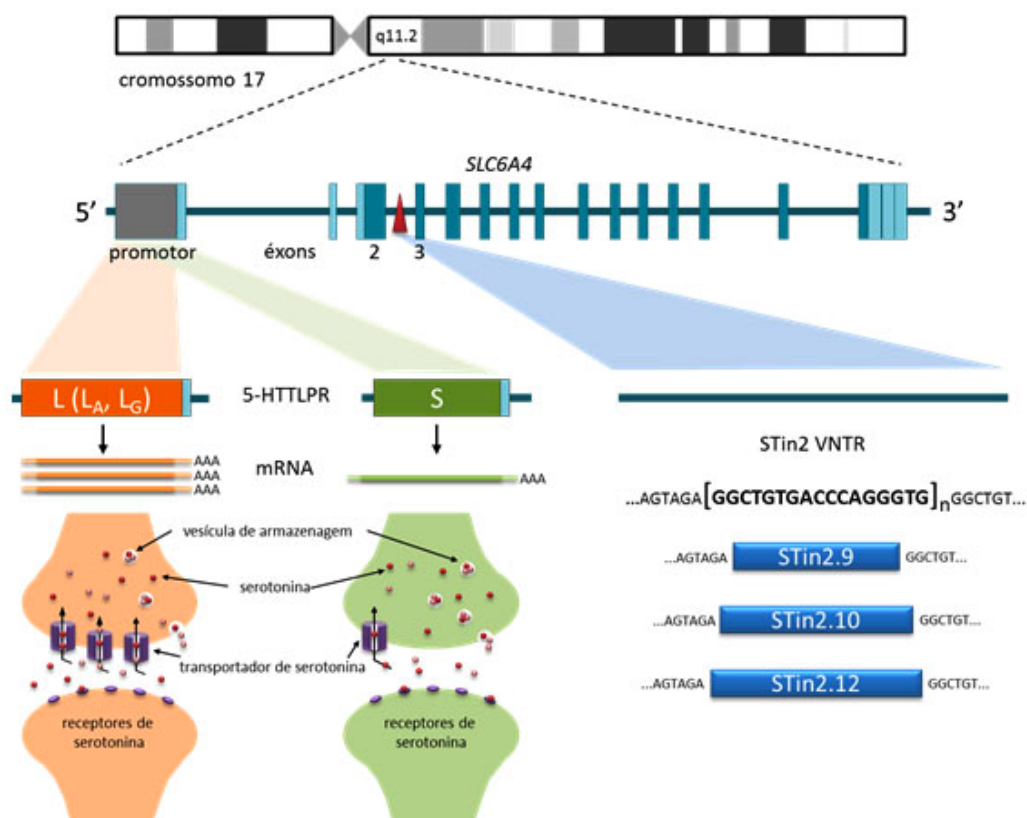


Figura 1: Visão esquemática dos polimorfismos do gene *SLC6A4*. O painel superior mostra uma representação simplificada do ideograma do cromossomo 17 humano. O segundo painel é uma representação do gene do transportador de serotonina (*SLC6A4*), incluindo a região promotora, éxons e íntrons. Logo abaixo estão representados os polimorfismos genéticos, dois da região promotora: 5-HTTLPR, gerando os alelos L (long) e S (short), e o rs25531, e um polimorfismo na região do íntron 2 (STin2 VNTR). O painel inferior do lado esquerdo representa a influência do polimorfismo 5-HTTLPR na transcrição gênica do transportador, e o painel inferior direito representa as variantes alélicas mais comumente encontradas no polimorfismo STin2 VNTR.

Embora muitos fatores contribuam para o TUT, incluindo as influências ambientais, culturais e familiares, O'Loughlin et al. ⁽¹⁰⁵⁾ observaram que a serotonina aumentava devido à nicotina e sugeriram que as variações no sistema serotoninérgico podem influenciar algumas características do TUT, tais como sintomas de abstinência de nicotina relacionada à disforia, à depressão e à ansiedade. Além disso, há evidências que suportam o efeito benéfico dos inibidores de recaptação de serotonina para cessação do tabagismo, sugerindo que o gene do 5-HTT são possíveis alvos para a compreensão e elucidação do comportamento tabagista.

Os polimorfismos presentes no gene do 5-HTT têm sido cada vez mais associados ao TUT e, na última década, tem sido verificada a associação com o

polimorfismo 5-HTTLPR⁽⁷⁰⁾. No entanto, alguns estudos não relataram associação entre o comportamento de fumar com o polimorfismo 5-HTTLPR^(46,49). Trummer et al.⁽⁴⁹⁾ sugerem que outros polimorfismos presentes no gene 5-HTT podem estar associados com o TUT e consideram o STin2 VNTR (5-HTTVNTR2) um candidato promissor.

Tem sido sugerido que pacientes com depressão maior tendem a apresentar menor disponibilidade do transportador de serotonina⁽⁶⁰⁾. Sarosi et al.⁽⁵⁹⁾ investigaram a associação do polimorfismo STin2 VNTR e disfunção cognitiva na depressão maior, e encontraram uma frequência significativamente maior do genótipo em homozigose STin2 10/10 no grupo de depressivos em relação ao controle. Por outro lado, foi observado aumento significativo do alelo STin2.12 do VNTR em fumantes comparado com indivíduos que nunca fizeram uso do cigarro⁽⁴²⁾.

Os resultados para os estudos de polimorfismos do gene 5-HTT e hábito tabagista são conflitantes na literatura. Por isso se destaca a importância de novos estudos. Sabe-se que existe uma diferença na frequência de alelos do STin2 VNTR entre grupos étnicos diferentes. É conhecido que o alelo STin2.12 do VNTR é mais frequente em japoneses do que nos afro-americanos e nos americanos europeus⁽¹⁰⁶⁾. Assim, a heterogeneidade da amostra entre os estudos, os diferentes tamanhos de amostra e os aspectos culturais das diferentes regiões podem apresentar uma grande influência sobre a discordância entre os resultados.

Kremer et al.⁽⁴²⁾ analisaram associação entre fumantes atuais, fumantes que cessaram o consumo de tabaco e nunca fumantes associados a dois polimorfismos do gene transportador de serotonina (SERT) e encontraram um excesso significativo do alelo longo do polimorfismo 5-HTTLPR com o alelo 12 do STin2 VNTR em fumantes atuais e fumantes que cessaram o consumo do tabaco quando comparados a nunca fumantes. Já Sieminska et al.⁽⁴⁹⁾ e Nilsson et al.⁽⁷⁰⁾ selecionaram fumantes diários e esporádicos, caracterizando os fumantes que realmente têm um alto grau de dependência e são, provavelmente, aqueles que, sem dúvida, sofrem de grande suscetibilidade genética. A forma de seleção e caracterização não só do grupo de fumantes, mas também dos controles nunca fumantes foram extremamente importante na análise dos resultados.

Uma hipótese neuroquímica foi sugerida, na qual a nicotina aumenta a liberação de 5-HT no cérebro, e a remoção de nicotina poderia ter um efeito contrário ^(107,108), com consequente diminuição serotoninérgica. Lovejoy et al. ⁽¹⁰³⁾ observaram *in vitro*, aumento de expressão do 5-HTT associada ao alelo 12 em relação ao alelo 10 do STin2 VNTR. Neste contexto, pode-se sugerir que os indivíduos com alelo 12 têm maior risco de se tornarem dependentes de nicotina. Tem sido também reportado que o alelo 12 do STin2 VNTR pode atuar como um potencializador transcricional ^(54,61,109,110), ou seja, o polimorfismo STin2 VNTR teria algum efeito sobre a quantidade de 5-HTT. Em um estudo foi estabelecido que, apesar de dados *in vitro* e resultados prévios indicando que o alelo STin2.12 tem função de potencializar a transcrição, quando o STin2.12 está em homozigose (12/12) e está relacionado com baixa quantidade de 5-HTT no cérebro ⁽⁶¹⁾. Uma função alterada do polimorfismo STin2 VNTR no gene *SLC6A4* pode estar envolvida em TUD, uma vez que o alelo STin2.12 tem sido relatado como sendo um potencializador da transcrição associado com a suscetibilidade ao abuso de substâncias ⁽¹¹¹⁾.

3 OBJETIVOS

*“As pessoas não se precisam, elas se completam...
Não por serem metades, mas por serem inteiras,
dispostas a dividir objetivos comuns, alegrias e vida...”*

(Mário Quintana)

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo de associação envolvendo o polimorfismo STin2 VNTR do gene transportador de serotonina (*SLC6A4*) em TUT e transtornos do humor entre pacientes com TUT do CRATT e pessoas que nunca fumaram.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar as características sócio-demográficas, clínicas, situação trabalhista, transtornos do humor, risco para o uso do álcool e risco para o uso de sedativos em pacientes com TUT e controles nunca fumantes;
2. Analisar as características sócio-demográficas, clínicas, situação trabalhista, gravidade dos transtornos depressivos, história familiar de TUT e história familiar de transtornos mentais em pacientes com TUT com e sem transtornos do humor e controles nunca fumantes com e sem transtornos do humor;
3. Analisar a associação do polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* com TUT em pacientes com TUT e controles nunca fumantes; e com TUT e transtornos do humor em pacientes com TUT com e sem transtornos do humor, e controles nunca fumantes com e sem transtornos do humor;
4. Analisar a associação do polimorfismo STin2 VNTR do gene *SLC6A4* com a história tabagística, a gravidade da dependência de nicotina, número de cigarros consumidos por dia, idade de início do uso de tabaco, número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos, tentativas de cessação do tabaco e cessação do tabaco em pacientes com TUT.

4 METODOLOGIA

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.”*

(Martin Luther King)

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Para atingir os objetivos 1, 2 e 4, foi realizado um estudo transversal e, para o objetivo 3, o delineamento do estudo foi de associação do tipo caso-controle.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado em dois serviços distintos do Hospital Universitário de Londrina (HUL), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), localizada na cidade de Londrina, região norte do estado do Paraná, Brasil. Um dos serviços utilizados foi o Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo (CRATT), instalado no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), e o outro foi na Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade da UEL (DASC) do HUL. O CRATT foi implantado atendendo ao Programa Nacional de Controle do Tabagismo (PNCT) do Ministério da Saúde (MS), por meio do Instituto Nacional de Câncer (INCA), sendo credenciado para abordagem e tratamento do fumante, no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (CNES), pelo MS, de acordo com a Portaria SAS/MS 442 de 13 de agosto de 2004, que elaborou o Plano para Implantação da Abordagem e Tratamento do Tabagismo na Rede do Sistema Único de Saúde (SUS) ^(112,113).

4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população do estudo foi constituída por fumantes que buscaram tratamento no CRATT, dispostos a serem acompanhados por um ano na tentativa da cessação do tabaco, residentes em Londrina, e por nunca fumantes (controles) que trabalham

na UEL, também moradores desta cidade. A abordagem do fumante consistia em sessões, de uma hora e meia, em grupo de apoio, que contava com 10 a 15 participantes. Primeiramente, foi realizada a consulta inicial de avaliação clínica do fumante, seguida de quatro sessões iniciais semanais, duas quinzenais com os mesmos participantes e uma sessão mensal para prevenção de recaída, até completar um ano. Tais sessões foram coordenadas por dois profissionais de saúde capacitados pelo INCA. O CRATT realizava sessões grupais com base na terapia cognitivo-comportamental e individual na qual se utilizavam terapias combinadas de fármacos (antidepressivos e terapias de reposição de nicotina) ⁽¹¹³⁾.

Os critérios de inclusão para ambos os grupos foram: idade entre 18 e 65 anos, ambos os sexos, qualquer etnia e consentimento de participação voluntária no estudo. Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: presença de delirium, demência, amnésia e outros transtornos cognitivos.

A amostra foi de conveniência de tempo e lugar e atendeu aos critérios de inclusão e exclusão, sendo composta por 185 fumantes (95 depressivos e 90 não depressivos) do CRATT, e por 175 indivíduos nunca fumantes (62 depressivos e 113 não depressivos) que trabalham na UEL. Os indivíduos nunca fumantes foram controlados por idade, sexo e etnia em relação aos fumantes em tratamento no AEHU/UEL. O tamanho da amostra foi calculado considerando um poder de 0,8, um efeito de 0,15 e $\alpha=0,05$ resultando em um tamanho amostral de aproximadamente 350.

4.4 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados entre março/2011 e julho/2012, após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL, com parecer CEP-UEL 037/2011, conforme a Resolução Nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Anexo A).

Foram selecionados como coletadores para o grupo de tabagistas a pesquisadora principal do estudo e dois médicos psiquiatras e também pesquisadores. A pesquisadora e os dois médicos foram capacitados em Abordagem Intensiva para Tratamento do Fumante, preconizada pelo INCA, para atuação em centros especializados na abordagem e tratamento do fumante. Os

demais instrumentos utilizados no estudo, não incluídos na capacitação do INCA, já eram utilizados pelos coletadores em outras pesquisas do serviço. Assim, todos estavam familiarizados com os mesmos e habilitados para utilizá-los na coleta de dados. Foram selecionados como coletadores para o grupo dos nunca fumantes (controle) os dois médicos psiquiatras e a pesquisadora principal.

4.4.1 Coleta de Dados

Os fumantes foram abordados individualmente pelos coletadores, em local privado, durante a avaliação clínica inicial para participação nos grupos terapêuticos. Os nunca fumantes foram convidados a participar da pesquisa com procedimentos de coleta de dados iguais aos dos fumantes.

Todos os entrevistados, de ambos os grupos, receberam previamente todas as informações pertinentes à pesquisa, o compromisso da manutenção do sigilo dos dados, a possibilidade de retirar o consentimento na participação a qualquer momento, sem sofrer nenhuma censura. Nessa ocasião, também tiveram sanadas todas suas dúvidas e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias (Apêndice A).

Semanalmente, os pesquisadores fizeram a análise crítica dos dados coletados e procederam à busca dos dados incompletos. Em seguida, os instrumentos completos foram encaminhados para digitação do banco de dados.

4.4.2 Instrumentos Para a Coleta de Dados

Para a coleta de dados, foram utilizados cinco instrumentos (Apêndice B).

4.4.2.1 Caracterização Sócio-demográfica, Situação de Trabalho, Clínica e Hábito Tabagístico dos Participantes

Este instrumento foi composto por questões elaboradas pelos pesquisadores do CRATT, a partir do referencial teórico sobre o tema, e por outras extraídas da proposta de instrumento utilizado pelo INCA, usado nos Ambulatórios de Abordagem e Tratamento do Tabagismo.

As características sociodemográficas usadas foram: idade, sexo, etnia, situação conjugal e escolaridade.

Para a situação de trabalho, foram incluídos: situação trabalhista (empregado, estudante, desempregado, auxílio-doença).

As características clínicas contempladas foram: gravidade de depressão, índice de massa corpórea (IMC), história familiar de transtornos mentais.

Para o hábito tabagístico, buscou-se conhecer: idade de início do uso de tabaco, número de cigarros consumidos por dia ao longo dos anos (anos/maço), número de cigarros consumidos por dia, gravidade de dependência de nicotina, tentativas de cessação do tabaco, cessação do tabaco e história familiar de TUT.

4.4.2.2 Teste de Triagem do Envolvimento com Álcool, Tabaco e Outras Substâncias (ASSIST versão 3.0)

O ASSIST (*Alcohol Smoking and Substance Involvement Screening Test*) é um questionário para rastreamento, desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde para pessoas que fazem uso de substâncias psicoativas, que abrangem: tabaco, álcool, canabinóides, cocaína, estimulantes do tipo anfetamina, sedativos, alucinógenos, inalantes, opióides e outras drogas ⁽¹¹⁴⁾. A adaptação transcultural para a língua portuguesa foi realizada por Henrique et al. ⁽¹¹⁵⁾. Os escores para o álcool foram: 0-10 para baixo risco; 11- 26 para risco moderado; e ≥ 27 para alto risco. A pontuação para todas as outras substâncias foi: 0-3 para baixo risco; 4-26 para risco moderado; e ≥ 27 para alto risco.

4.4.2.3 Avaliação do Diagnóstico dos Transtornos do Humor

Os critérios diagnósticos para transtornos do humor, bem como de dependência de nicotina foram avaliados por médicos psiquiatras treinados, com experiência clínica e familiarizados com o instrumento, de acordo com a Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV, versão clínica (SCID-I), baseada nos critérios diagnósticos, do eixo I, da Associação Americana de Psiquiatria (APA), do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição, DSM-IV, traduzida e adaptada para o português por Del-Ben et al. ⁽¹¹⁶⁾.

4.4.2.4 Avaliação da Gravidade da Depressão

A avaliação da gravidade da depressão foi realizada pela Escala de Avaliação para Depressão de Hamilton (HAM-D), desenvolvida por Hamilton ⁽¹¹⁷⁾, traduzida e adaptada para a população brasileira por Moreno e Moreno ⁽¹¹⁸⁾. A escala HAM-D possui de 17 a 21 itens, dependendo da versão, ou ainda 24 itens (os três tópicos adicionais são desamparo, desesperança e desvalia) e os escores da HAM-D variam de acordo com a versão. Os itens são avaliados segundo a intensidade e a frequência dentro de um período determinado de dias. Hamilton ⁽¹¹⁷⁾ nunca citou um escore para diferenciar normalidade de morbidade, mas os pesquisadores definiram suas amostras de pacientes deprimidos, baseados apenas em um escore na escala, apesar de a instrução de não ser utilizada como instrumento diagnóstico. O autor não propôs um ponto-padrão de corte, mas, na prática, se aceita que escores acima de 25 pontos identificam pacientes gravemente deprimidos; entre 18 e 24 pontos, pacientes moderadamente deprimidos; e entre 7 e 17, pacientes levemente deprimidos. Foi utilizada a versão com 21 itens, (faixa de variação de 0 a 62), sendo atribuídos escores a cada item individualmente, podendo este variar de zero até dois ou quatro, dependendo do item em questão.

4.4.2.5 Teste de Fagerström para Dependência de Nicotina (FTND)

É o teste mais amplamente usado na detecção de dependência de nicotina entre fumantes. As mais conhecidas destas medidas são: o *Fagerström Tolerance Questionnaire* (FTQ), publicado há 30 anos ^(119,120); sua revisão, o Teste de Fagerström para dependência de nicotina (FTND), desenvolvido por Heatherton et al. ⁽¹²¹⁾; e sua confiabilidade, testada por Pomerleau et al. ⁽¹²²⁾. Foi traduzido e adaptado para o português por Carmo e Pueyo ⁽¹²³⁾. O FTND possui uma escala de seis itens e a pontuação de 0 a 10. Os escores para dependência de nicotina permitem a classificação da dependência em cinco níveis: muito baixo (0 a 2 pontos); baixo (3 a 4 pontos); moderado (5 pontos); alto (6 a 7 pontos); muito alto (8 a 10 pontos) ⁽¹²⁴⁾. Uma soma acima de seis pontos indica que, provavelmente, o paciente terá desconforto significativo (síndrome de abstinência) ao deixar de fumar ⁽¹²⁵⁾. O ponto de corte de FTND para a dependência de nicotina foi ≥ 5 ⁽¹²⁶⁾.

4.4.2.6 Índice de Massa Corpórea (IMC)

O IMC foi calculado dividindo-se peso por altura e expresso em Kg/m².

4.4.2.7 Número de Cigarros Consumidos por dia ao Longo dos Anos (Anos/Maço)

Anos/Maço foi computado por anos fumados multiplicados por número de cigarros/dia dividido por 20.

4.4.2.8 História Familiar

A história familiar do TUT e transtornos mentais constou de relato da presença e tratamento dos transtornos em familiares em primeiro grau dos sujeitos.

4.4.2.9 Análise do Monóxido de Carbono Exalado

A cessação do tabagismo foi mensurada por meio do Monóxido de Carbono no ar Exalado (COex). O COex é o padrão ouro para verificar se o paciente cessou ou não o consumo de tabaco e foi utilizado em todos os participantes durante todo estudo. A medida do COex tem sido a mais utilizada na prática clínica e em pesquisas para cessação do tabagismo por ser um método não invasivo, de baixo custo e com resultado imediato ⁽¹²⁷⁾. O COex foi medido em um analisador Micro CO Meter da Micro Medical Limited, Rochester, Kent, UK. Este aparelho mede a concentração de Coex, que é expressa em partes por milhão (ppm), através de um sensor eletroquímico. O COex é um método que deve ser usado e o ponto de corte deve ser 6 ppm para que tenha boa sensibilidade ⁽¹²⁵⁾.

4.4.2.10 Coleta da Amostra e Análise Molecular

Os fumantes realizaram a coleta no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina (HUL), e os controles nunca fumantes realizaram a coleta na DASC.

As amostras consistiram de 5 mL de sangue periférico coletados a vácuo, com agulhas e tubos estéreis e descartáveis, contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de sangue para análise do gene 5-HTT foram enviadas para o Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos de DNA (LEAP DNA) da UEL, Paraná, Brasil, para extração do DNA e genotipagem, conforme metodologia descrita.

4.4.2.11 Obtenção do DNA Genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de 200 µL de sangue periférico dos participantes do estudo. A técnica do presente trabalho consistiu basicamente no rompimento enzimático de membranas celulares, eliminação de proteínas e ácidos graxos por ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA com etanol por meio da utilização do Kit Biopur de extração de DNA (Biometrix Diagnostic, Curitiba-PR, Brasil). Ao DNA obtido foi adicionado 50 µL de tampão específico do Kit Biopur, e posteriormente o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm, e armazenado em *freezer* a -20°C até à sua utilização em análises de genotipagem.

A integridade do DNA foi analisada por eletroforese a 100 v, em gel de agarose 1%.

4.4.2.12 Reação em Cadeia da Polimerase

A análise do polimorfismo (STin2 VNTR) do gene *SLC6A4* foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR- AS) com DNA genômico (100ng), utilizando-se primers descritos por Klauck et al. ⁽¹²⁸⁾, como a seguir: *Primer Forward* - 5'TGGATTCCTTCTCTCAGTGAATTGG3' e *Primer Reverse* - 5'TCATGTTCCCTAGTCTTACGCCAGTG3. As condições da reação de amplificação foram 1,25mM de DNTP, 2,5µM de cada iniciador, 50mM de MgCl₂, 10% de Buffer, tampão com 1,25 unidades de Taq polimerase (InvitrogenTM, Carlsbad, California, USA) e 100 ng de DNA.

Realizaram-se as ciclagens no Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) como segue: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de um minuto de 94°C para desnaturar a dupla fita de DNA, um minuto de 60°C para anelamento dos primers e um minuto de 72°C para extensão das cópias,

com uma extensão final de 20 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata (AgNO₃). Foram amplificados três distintos fragmentos: 389 pb (alelo de 12 repetições); 355 pb (alelo de 10 repetições); 338 pb (alelo de 9 repetições), conforme demonstrado na figura 2.

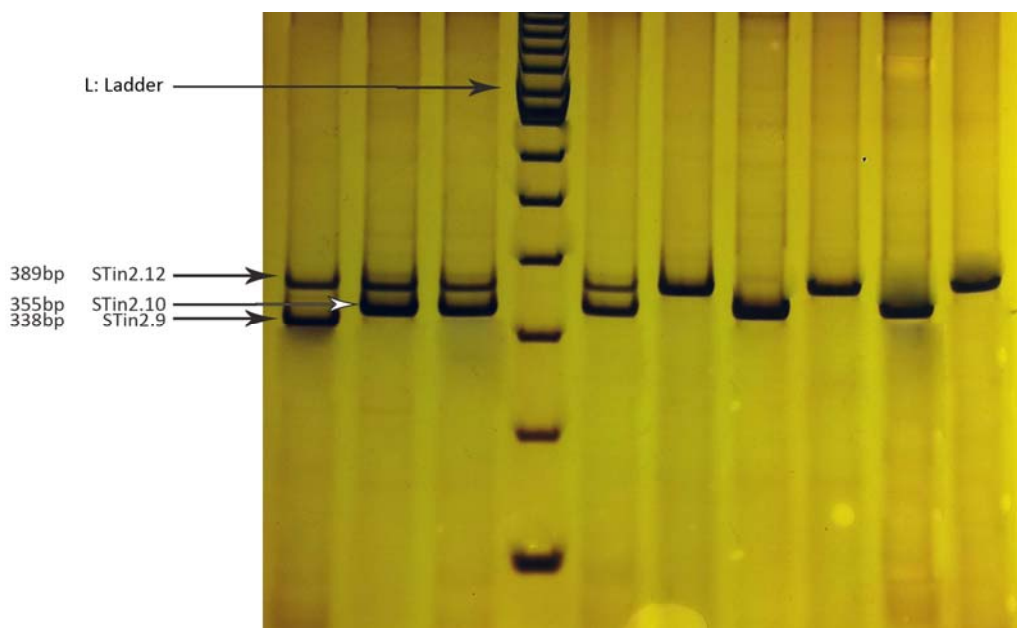


Figura 2: Perfil eletroforético do polimorfismo genético STin2 VNTR. Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata (AgNO₃). As setas indicam os tamanhos específicos dos alelos 9, 10 e 12. L: Ladder – Tamanho de fragmento de 100 pb.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No primeiro artigo, intitulado *SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study*, as frequências gênicas e alélicas observadas em pacientes com TUT e nunca fumantes foram comparadas, utilizando o teste de qui-quadrado e a razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95%. Foi utilizada a regressão logística bivariada para avaliar a associação entre TUT (com os controles como grupo de referência) como variável dependente e os alelos e genótipos STin2 como variáveis explicativas, controlando para os efeitos de outras variáveis explicativas, incluindo transtornos do humor, IMC, etnia, idade, sexo, anos de educação etc. Foram utilizados os coeficientes de regressão logística

das variáveis independentes como estimadores do OR e respectivos intervalos de confiança de 95%. As relações entre os alelos e genótipos *STin2* e as variáveis contínuas (por exemplo, idade, anos de estudo) foram avaliadas, utilizando a análise de variância (ANOVA). Associações entre grupos de diagnóstico (casos *versus* controles) ou frequências gênicas e dados sócio-demográficos e clínicos foram examinados, usando o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os testes estatísticos foram bilaterais e adotou-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa SPSS (versão 20).

No segundo artigo, intitulado *STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders*, o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher foi utilizado para verificar diferenças variáveis categóricas sócio-demográficas e clínicas entre os quatro grupos de estudo. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar as diferenças de variáveis sócio-demográficas e clínicas contínuas entre as quatro categorias. As análises *a posteriori* foram realizadas utilizando o teste de Tukey. As diferenças na distribuição de genótipos ou alelos entre os grupos de estudo foram examinados com o teste de qui-quadrado e análise de regressão logística. A análise de regressão multinomial foi empregada para examinar as associações entre os diferentes grupos de estudo e as distribuições genotípicas ou alélicas e dados clínicos e sócio-demográficos. O grupo de controle, que nunca fumou (sem TUT e sem alterações do humor), foi o grupo de referência e comparado com cada um dos outros três grupos de diagnóstico. A análise fatorial exploratória foi utilizada para interpretar as associações entre os grupos diagnósticos (transtornos do humor e TUT), polimorfismo genético e dados sócio-demográficos e clínicos relevantes. A rotação Varimax dos componentes principais foi utilizada para interpretar os dados. O número de fatores foi baseado nos auto-valores > 1 . Todos os testes foram bilaterais e nível de significância de 5%. As análises foram realizadas nos programas SPSS (versão 20) e Statistica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.
A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos
Mesmo quando todos dizem que ele é impossível.”*

(Cora Coralina)

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de dois artigos científicos, sendo um publicado e outro submetido, respectivamente, a periódicos indexados no Medline.

O artigo 1 foi publicado na BMC Genetics 2014, **15:78**, doi: 10.1186/1471-2156-15-78, com fator de impacto 2.81 e intitulado: “SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study”.

O artigo 2 foi submetido ao Journal of Affective Disorders, que apresenta fator de impacto 3.295 e intitulado: “STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders”.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study

Márcia Regina Pizzo de Castro¹, Michael Maes^{2,3,4*}, Roberta Losi Guembarovski⁵, Carolina Batista Ariza⁵, Edna Maria Vissoci Reiche⁶, Heber Odebrecht Vargas¹, Mateus Medonça Vargas¹, Luiz Gustavo Piccoli de Melo¹, Seetal Dodd^{2,7,8}, Michael Berk^{2,7,8}, Maria Angelica Ehara Watanabe⁵ and Sandra Odebrecht Vargas Nunes¹

Abstract

Background: The aim of this study was to determine if variable number of tandem repeats (VNTR) in the second intron (STin2) of the *serotonin transporter (SLC6A4)* gene was associated with tobacco use disorder, successful smoking cessation, or smoking characteristics. In this case–control study, patients with current tobacco use disorder, diagnosed according to DSM IV criteria (n = 185), and never-smokers, diagnosed according to CDC criteria (n = 175), were recruited and received 52 weeks of combined pharmacotherapy and cognitive therapy. Successful smoking cessation was defined as exhaled carbon monoxide < 6 ppm. *SLC6A4* gene STin2 VNTR polymorphism was assessed using a Multiplex-PCR-based method. At baseline, participants were evaluated using the Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) and the ASSIST scale.

Results: The STin2.12 allele (OR = 2.45; 95% CI = 1.44-4.15, $p < 0.001$) was associated with an increased risk for tobacco use disorder, while the STin2.10/10 genotype (OR = 0.42; 95% CI 0.25-0.71, $p < 0.001$) decreased risk. There were no significant associations between tobacco use disorder and the STin2.10 or STin2.9 alleles or the other genotypes (STin2.12/12, 12/10, 12/9, 10/9 or 9/9). There were no significant associations between the STin2 genotypes and alleles and successful smoking cessation, smoking characteristics and increased alcohol or sedative use risk.

Conclusions: Our results suggest that the STin2.10/10 genotype and STin2.12 allele are associated with tobacco use disorder or nicotine dependence, but not with treatment response or severity of dependence. It is hypothesized that the STin2.12 allele by modulating the metabolism of serotonin may participate in the pathophysiology of tobacco use disorder or nicotine dependence.

Keywords: STin2 VNTR, Tobacco use disorder, Smoking cessation, Serotonin, Inflammation, Oxidative stress, Polymorphism, Genetic

* Correspondence: dr.michaelmaes@hotmail.com

²IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

³Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Tobacco use disorder is a leading cause of mortality and disease burden [1,2]. Tobacco use disorder is a complex behavior that includes a number of stages of addiction, such as vulnerability to onset of use, continued use, propensity to become dependent and tobacco withdrawal [3-5]. 19% of ever smokers convert to daily smoking by the age of 15 years and 10% progress to smoking 20 cigarettes or more per day by the age of 18 [3]. Quitting smoking is beneficial to health at any age. Cigarette smokers who quit before age 35 years have mortality rates similar to those who never smoked. It is estimated that about 68.8% of adult smokers want to stop smoking, 52.4% attempted to quit in the past year, 6.2% had quit recently, 48.3% had been advised by a health professional to quit, and 31.7% had used counseling and/or medications when they tried to quit [4]. More than 80% of individuals who have tobacco use disorder attempt to quit smoking. 60% of the quitters, however, relapse within one week and less than 5% remain in sustained remission during a period of 12 months or longer.

Genetic factors and heritability contribute strongly to the onset of tobacco use and the development of tobacco use disorder [5]. Serotonin and the serotonin transporter (5-HTT) are implicated in the pathophysiology of tobacco use disorder [6]. The *SLC6A4* gene is located on chromosome 17 and three polymorphisms have been described: an insertion deletion in the promoter region, called 5-HTTLPR (serotonin transporter linked polymorphic region), a SNP G-T polymorphism in a non-coding 3' UTR, and the STin2 polymorphism, which is a 17 bp variable number of tandem repeat (VNTR) located in the second intron in *SLC6A4* [7]. The *SLC6A4* gene is the most frequently studied polymorphism in depression and tobacco use disorder [8,9]. The same gene may in part determine vulnerability for depression when exposed to multiple life stressors [10]. A study in 185 current smokers showed a positive association between neuroticism, an anxiety-related personality trait, and smoking behaviors and the S expression of the 5-HTTLPR region, but not the L genotype [11].

While there are now many reports on the association between 5-HTTLPR polymorphism of the *SLC6A4* gene and smoking behavior [11-25], there are only few studies on the *SLC6A4* gene STin2 polymorphism in tobacco use disorder [7,26]. The STin2 allelic variants were identified as 10-repeat and 12-repeat alleles that have been identified in all ethnicities, and the less common 9-repeat allele was only found in individuals of European or African descent [27]. An altered function of the STin2 VNTR in the *SLC6A4* gene may be involved in tobacco use disorder since the STin2.12 allele has been reported to be a transcriptional enhancer associated with susceptibility to substance abuse [28]. It is now well established

that nicotine increases serotonergic neurotransmission in the brain and symptoms of nicotine withdrawal may be mediated by a lowered serotonergic neurotransmission [7,29]. The STin2 polymorphism has also been associated with cognitive dysfunction in major depression [30].

Interestingly, the serotonin system and the *SLC6A4* gene have been implicated in the pathophysiology of psychiatric disorders which show a strong comorbidity with tobacco use disorder, including mood disorders and alcohol abuse [6,31]. Tobacco use and mood disorders are commonly comorbid conditions in patients of cigarette smoking cessation treatments [15,32-36]. In depressed smokers, depletion of serotonin in the brain is associated with a high risk for suicide and attempted suicide [35,37]. The short allele of 5-HTTLPR and the 12 repeat allele of STin2 are associated with a history of suicide attempts [38]. The serotonergic system has been associated with several personality traits that are related to an increased incidence of smoking, increased nicotine dependence, and difficulty in quitting smoking [39].

The aim of this paper was to delineate whether STin2 polymorphism of the *SLC6A4* gene is associated with a) tobacco use disorder, b) successful smoking cessation, c) smoking characteristics, including age at onset of tobacco use, duration of illness, lifetime cigarette consumption, years of smoking, severity of nicotine dependence, and d) comorbid substance use disorders, including alcohol and sedative abuse.

Methods

Cases and controls

In this case-control study, patients with current tobacco use disorder (n = 185) were recruited from outpatients at the Center of Approach and Treatment for Smokers, a smoking cessation program at Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. The controls were never-smokers (n = 175), recruited from staff at UEL. Patients with tobacco use disorder and never-smokers were men and women aged 18-65 and all ethnicities were accepted for this study. The diagnosis of tobacco use disorder was made by a senior psychiatrist using the semi-structured (SCID) interview translated into Portuguese [40]. In this study we only included current smokers who had smoked at least 100 cigarettes during their lifetime and, at the time of the interview, reported smoking every day or some days [41]. The controls, i.e. never-smokers, were subjects without tobacco use disorder who reported that they had never smoked a cigarette over their lifetime. Our never-smokers criteria are thus more stringent than the CDC criteria (41) for never-smokers, i.e. individuals who smoked less than 100 cigarettes in their lifetime. Cases with lifetime axis 1 diagnoses other than tobacco use disorder and affective disorders were excluded, including schizophrenia and psycho-organic syndromes. Patients

with neuro-inflammatory and immune-inflammatory disorders were also excluded, including Parkinson's disorder, stroke, multiple sclerosis, lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, COPD, etc. The same exclusion criteria were applied to the never-smokers. The sample size was based on an a priori power calculation, which considered that with a power of 0.8, an effect size of 0.15 and $\alpha = 0.05$ the total sample size should be around 350. A self-reported questionnaire was used to obtain information on socio-demographic characteristics, such as age, gender, marital status, ethnicity, years of education, and employment status. The study was conducted from March 2011 to July 2012. All subjects gave written informed consent to participate in the study after approval by the Ethics Research Committee at UEL, number 037/2011.

Smoking characteristics

Smoking behavior was assessed through an interviewer-administered structured questionnaire. The Fagerström test for Nicotine Dependence (FTND) [42], translated and validated for use in Portuguese [43], was administered to all patients with tobacco use disorder. The FTND produces a score ranging from 0 to 10. Nicotine dependence was defined as a score ≥ 6 [44]. The number of pack-years was calculated as the number of cigarettes smoked per day multiplied by number of years smoked and divided by 20 (1 pack has 20 cigarettes).

Smoking status was also evaluated using exhaled carbon monoxide (CO_{EXH}). CO_{EXH} was measured using a Micro CO Meter with an electrochemical sensor (Micro CO- Micro Medical Ltd, Rochester, Kent, UK). All participants were instructed to breathe deeply and to hold their breath for 20 seconds and then to exhale slowly and completely through a mouthpiece. The CO_{EXH} levels were dichotomized using 6 ppm as threshold value [45]. This threshold value was used as an additional inclusion criterion. Thus, never-smokers all had $CO_{EXH} < 6$ ppm, whereas those with current tobacco use disorder had $CO_{EXH} \geq 6$ ppm.

Successful smoking cessation

All cases were treated for a period of 52 weeks with cognitive behavioral therapy sessions administered to groups of 10–15 participants and lasting for about 1½ hours. After the patient received an individualized assessment with the physician, he/she attends four weekly group sessions followed by two biweekly group sessions and then monthly sessions for a period of 52 weeks. Parallel to these group sessions, patients also receive pharmacological intervention, bupropion or nicotine replacement therapy, in accordance with the guidelines of the Ministry of Health, Brazil [46,47]. The combined program of tobacco use-focused cognitive therapy and

pharmacological treatment is effective for both genders and depressed and non-depressed smokers [15]. Successful smoking cessation was assessed at the end of the treatment period as exhaled breath $CO_{EXH} < 6$ ppm. 64 of 185 subjects with tobacco use disorder were able to quit smoking during our 52 week treatment program.

Substance use disorders

We used the Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST), which was developed by the World Health Organization, to screen levels of risk for alcohol and sedative use. We computed ASSIST scores for all participants. A risk score for alcohol was estimated as low risk (score 0–3), moderate risk (score 11–26) or high risk (score ≥ 27) and a risk score for sedatives was calculated as low risk (score 0–3), moderate risk (score 4–26) or high risk (score ≥ 27) [48]. The diagnoses of mood disorders, that is depressive disorder and bipolar disorder, was made by a trained psychiatrist using the semi-structured DSM-IV interview (SCID) using a validated Portuguese translation [40]. There were 112 individuals diagnosed with depression and 45 with bipolar disorder.

Genotyping

Peripheral blood samples were obtained with EDTA as anticoagulant from all participants. Genomic DNA was extracted from 200 μ L of peripheral blood cells using the Biopur Kit (Biometrix Diagnostic, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The DNA pellet was re-suspended in 50 μ L of Biopur Kit specific buffer, quantified by spectrophotometry, and stored in a -20°C freezer until use in genotyping analyses. Allelic Specific polymerase chain reaction (AS-PCR) for STin2 VNTR polymorphism detection were realized with genomic DNA (100 ng) with specific primers described by [48]. Forward primer — 5'TGGATTTCTTCTCTCAGTGAATTGG3' and Reverse primer — 5'TCATGTTCTAGTCTTACGC-CAGTG3'. Samples were amplified using the kit buffer plus 1.25 units Taq polymerase (Invitrogen TM, Carlsbad, California). PCR conditions were: 5 min denaturation at 94°C , 40 cycles of 1 min at 94°C , 1 min at 60°C and 1 min at 72°C , and 20 min elongation at 72°C in a Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplicons were analyzed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel and detected by a non radioisotopic technique using a commercially available silver staining method.

Statistical analyses

The gene frequencies observed in patients with tobacco use disorder and never-smokers were compared using analyses of contingency tables (χ^2 tests) with calculation of the Odds Ratios (OR) with a 95% confidence interval (CI). We used bivariate logistic regression analyses to

assess the association between tobacco use disorder (with the controls as reference group) as dependent variable and the STin2 alleles and genotypes as explanatory variables, while controlling for the effects of other explanatory variables, including mood disorders, BMI, ethnicity, age, gender, years of education, etc. We used the logistic regression coefficients of the independent variables as estimators of the OR with 95% CIs. Relationships between the STin2 alleles and genotypes and continuous variables (e.g. age, years of education) were examined using analyses of variance (ANOVAs). Associations between diagnostic groups (cases versus controls) or gene frequencies and socio-demographic and clinical data were examined using contingency tables or Fisher exact probability test. Data have been expressed as mean \pm standard deviation (SD). All the analyses were performed using SPSS (Version 20). A significance level of p -values \leq 0.05 was used for statistical significance.

Results

Socio-demographic and clinical characteristics

Table 1 shows the socio-demographic and clinical characteristics of patients with current tobacco use (cases) and never-smokers (controls). No p -correction was employed to assess the results of multiple statistical univariate analyses carried out on the clinical and socio-

demographic data because we used these results to delineate the relevant explanatory variables that were used as determinants of independent association with the diagnostic groups in multivariate analyses. Without p -correction, we found that there were significant differences in age between patients with tobacco use disorder and never-smokers. There were no significant differences in gender ratio or ethnicity between the two groups. Subjects with tobacco use disorder had a lower level of education than controls. In patients with tobacco use disorders there were more subjects who were unemployed or received disability support payments than in the control group. There were no differences in marital status and BMI between both groups. Patients with tobacco use disorder showed more mood disorders, and alcohol use and sedative use risk (and use of alcohol or sedatives) than never-smokers.

Association between tobacco use disorder and STin2 alleles and genotypes

Table 2 shows the association between the STin2 VNTR polymorphism and tobacco use disorder. The associations between tobacco use disorder and the 6 STin2 genotypes were tested at $p = 0.0083$ and those with the three STin2 alleles at $p = 0.0166$ (after p -correction was made for multiple comparisons). We found a significantly

Table 1 Socio-demographic and clinical characteristics of patients with current tobacco use disorder (TUD) and never-smokers

Variables	Smokers (n = 185)	Never-smokers (n = 175)	$\chi^2/F/ \Psi$	df	p value
Age (mean \pm SD)	48.7 (\pm 10.5)	45.7 (\pm 7.7)	9.78	1/358	$p < 0.002$
Gender Female/male	119/66	120/55	0.73	1	0.394
Self-reported ethnicity					
Caucasian	129	119	3.55	1	0.315
African	19	17			
Asian	5	12			
Others	32	27			
Years of education	9.64 (\pm 5.38)	15.98 (\pm 4.94)	135.78	1/358	$p < 0. < 0.001$
Employment status					
Employed or student versus unemployed or disability support	155/30	175/0	0.293	-	<0.001
Stable relationship versus other					$Pp0$ 0.109
Marital status	113/72	121/54	2.57	1	
BMI (kg/m²)	26.6 (\pm 5.9)	26.5 (\pm 4.2)	0.20	1/358	0.887
Mood disorders Yes/no	95/90	62/113	9.27	1	0.002
ASSIST sedative use risk Yes/no	14/171	0/175	0.196	-	<0.001
ASSIST alcohol use risk Yes/no	33/152	0/175	0.309	-	<0.001
ASSIST ALL Yes/no	44/141	0/175	0.363	-	<0.001

Results of analyses of variance (ANOVAS: age, BMI), χ^2 test (ethnicity, gender, marital status, mood disorders) or Fisher exact probability test (employment status, all ASSIST ratings).

Results are shown as mean \pm SD.

BMI: Body Mass Index.

ASSIST: Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test.

ASSIST ALL: sedative or alcohol use risk.

Table 2 STin2 VNTR polymorphism in patients with tobacco use disorder (TUD) versus never-smokers

STin2 VNTR		Never-smokers n = 175		TUD n = 185		OR	95% CI	χ^2	p
		Yes	No	Yes	No				
Genotypes	STin2 - 12/12	72	103	82	103	0.88	0.58-1.33	0.54	0.372
	STin2 - 12/10	50	125	71	114	1.56	1.00-2.42	3.88	0.049
	STin2 - 12/9	3	172	6	179	0.63	0.15-2.67	0.72	0.353
	STin2 - 10/10	49	126	26	159	0.42	0.25-0.71	10.60	< 0.001
	STin2 - 10/9	0	175	0	185	-	-	-	-
	STin2 - 9/9	1	174	0	185	-	-	-	-
Allelic Variants	STin2.12	125	50	159	26	2.45	1.44-4.15	11.38	< 0.001
	STin2.10	99	76	97	88	0.85	0.56-1.28	0.621	0.431
	STin2.9*	4	171	6	179	1.43	0.40-5.17	-	0.751

OR: odds ratio with 95% CI: confidence interval). All results of χ^2 tests (df = 1), except * result of Fisher exact probability test.

lower frequency of the STin2.10/10 genotype and a significantly higher frequency of the STin2.12 allele in patients with tobacco use disorder versus never-smokers. There were no significant differences in any of the other genotypes or for STin2.9 and STin2.10 alleles between cases and controls.

Table 3 shows the results of logistic regression analyses with tobacco use disorder as dependent variable (and controls as reference group) and the STin2.12 allele and STin2.10/10 genotype, age, gender, education, mood disorders, as explanatory variables. We found that the STin2.12 allele, the diagnosis of mood disorders and years of education predicted the incidence of tobacco use disorder versus never-smokers ($\chi^2 = 141.61$, df = 3, $p < 0.001$; Nagelkerke = 0.43). Forced entry of additional explanatory variables showed no significant effect of age (Wald = 1.91, df = 1, $p = 0.167$), gender (Wald = 1.24, df = 1, $p = 0.266$), self-reported ethnicity (Wald = 5.00, df = 1, $p = 0.288$), marital status (Wald = 2.21, df = 3, $p = 0.529$) and BMI (Wald = 1.58, df = 1, $p = 0.209$). There was a marginal, but significant effect of employment status (Wald = 4.01, df = 1, $p = 0.045$). We found that the STin2.10/10 genotype, mood disorders and years of education were associated with the incidence of tobacco use disorder versus never-smokers ($\chi^2 = 141.64$, df = 3, $p <$

0.001; Nagelkerke = 0.43). Forced entry of additional explanatory variables showed no significant effect of age, gender, self-reported ethnicity, marital status and BMI. There was a marginal but significant association between tobacco use disorder and employment status (Wald = 5.41, df = 1, $p = 0.020$). Thus, adjusting for additional relevant explanatory variables, including mood disorders, did not change the associations between tobacco use disorder and STin2 alleles and genotypes, and revealed that mood disorders and years of educations were significant predictors.

Association between smoking characteristics and STin2 alleles and genotypes

We have also computed whether, in patients with tobacco use disorder, there were associations between STin2 VNTR genotypes and alleles and successful smoking cessation 52 weeks after starting treatment and smoking characteristics, i.e. age at onset of tobacco use disorder, duration of illness, cigarettes/day and pack/years, the FNDS score and attempts to quit smoking. Table 4 shows the associations between the STin2 polymorphism and smoking cessation and smoking characteristics. Even at very liberal p-values (p-correction for multiple comparisons) of $p = 0.0083$ (for the genotypes)

Table 3 Results of automatic (step-up) binary logistic regression analyses with tobacco use disorder (TUD) as dependent variable (never-smokers as reference group) and the STin2.12 allele (regression 1) or STin.10/10 genotype (regression 2) and the other listed variables as explanatory variables

Variables		Wald	df	p value	OR	95% CI
Regression 1	STin2.12 allele	8.68	1	0.003	2.68	1.39 – 5.18
	Mood disorders	6.51	1	0.011	1.97	1.17 – 3.32
	Years of education	72.98	1	<0.001	0.76	0.71 – 0.81
Regression 2	STin2.10/10 genotype	8.14	1	0.004	0.38	0.20 – 0.74
	Mood disorders	6.64	1	0.010	1.98	1.18 – 3.34
	Years of education	72.99	1	<0.001	0.76	0.71 – 0.81

OR: odds ratio with 95% CI: 95% confidence interval.

Table 4 Associations between tobacco use disorder (TUD) characteristics and STin2 VNTR genotypes and allelic variants

Smoking parameters		n	Genotypes			Allelic variants	
			STin2 10/10 P*	STin2 12/10 P*	STin2 12/12 P*	STin2.12 P*	STin2.10 P*
Onset of TUD (years)	14.81 (±3.91)	185	0.868	0.170	0.156	0.868	0.146
Duration of TUD (years)	33.59 (±11.28)	185	0.061	0.262	0.478	0.061	0.837
Cigarettes/day	22.28 (±13.45)	185	0.120	0.987	0.377	0.120	0.274
Pack-years	37.02 (±28.11)	185	0.017	0.617	0.239	0.017	0.247
Fagerström score	5.71 (±2.21)	185	0.361	0.670	0.591	0.361	0.826
Attempts at smoking cessation	1, 2 or 3 attempts	86/67/32	0.948	0.852	0.728	0.948	0.739
Successful smoking cessation	Yes/no	64/185	0.658	0.858	0.612	0.658	0.630

Results are shown as mean ± SD.

*p values obtained in analyses of variance (all df = 1/183) or χ^2 tests (all df = 1).

and $p = 0.0166$ (for the alleles) we were unable to find any significant associations between the STin2 VNTR genotypes and alleles and successful smoking cessation and clinical smoking characteristics.

Comorbidities with substance use risk

Table 1 shows that participants with tobacco use disorder had significantly higher scores on the sedative and alcohol ASSIST scales than participants without tobacco use disorder. Nevertheless, we could not find any relationships between the STin2.12 allele or the STin2.10/10 genotype and the ASSIST scale measures. There was no significant association between the STin2.12 allele and alcohol use risk (29/255 versus 4/72, $\chi^2 = 1.76$, $df = 1$, $p = 0.184$), risk for sedative use (11/273 versus 3/73, $\chi^2 = 0.00$, $df = 1$, $p = 0.976$) or either sedative or alcohol use risk (37/247 versus 7/69, $\chi^2 = 0.81$, $df = 1$, $p = 0.367$). There was no significant association between the STin2.10/10 genotype and sedative use risk (4/71 versus 29/256, $\chi^2 = 1.67$, $df = 1$, $p = 0.196$), risk for sedative use (3/72 versus 11/274, $\chi^2 = 0.00$, $df = 1$, $p = 0.955$) or either sedative or alcohol use risk (7/68 versus 37/248, $\chi^2 = 0.81$, $df = 1$, $p = 0.391$).

Discussion

The major finding of this study is that the STin2.10/10 genotype decreased risk whereas the STin2.12 allele increased risk to tobacco use disorder. Our results are in agreement with a previous report showing that carrying the STin2.10 allele was more common in non-smokers compared with smokers, showing a protective effect of this allele [7]. Our results also extend previous findings on a "significant excess of the 5-HTTLPR long allele with the 12-repeat VNTR in smokers" [26]. In another study, it was found that allele 10 carriers were less prevalent in smokers than in non-smokers, indicating a protective effect of the STin2.10 allele [7]. Our results are not in agreement with those of Alves de Lima et al. [7] who found that subjects carrying STin2. 9 allele

carriers were more prevalent in smokers than in non-smokers. These contradictory results may be explained by differences in study populations. Thus while our study and that of Alves de Lima et al. [7] were both performed in a Brazilian population, the latter authors examined smokers with and without cancer, whereas in our study no cancer patients were included but instead more subjects with affective disorders.

In our study we found that patients with current tobacco use disorder showed a significantly increased prevalence of mood disorders, more work related disability and a lower education level than never-smokers. These results are consistent with previous reports which showed that current smoking is associated with subsequent depressive disorders, increased work disability and lower education levels [32,34,35,41]. Lower educational levels are additionally associated with the initiation of tobacco use disorder and with an increased risk to be unable to quit smoking [5]. Nevertheless, even after considering the effects of mood disorders and years of education the association between tobacco use disorder and the ST2in polymorphism remained significant.

The second major finding of this study is that there were no significant associations between the STin2 alleles or genotypes and either successful smoking cessation at week 52 or smoking characteristics, such as age at onset, duration of tobacco smoking, severity of tobacco smoking, number of cigarettes/day or packs/year etc. These negative findings extend those of a previous study showing that the *SLC6A4* gene is not a major determinant associated with attempts to quit smoking [19]. As Kremer et al. [26] we detected a highly significant association between the 5-HTT and the case-definitions of tobacco use disorder (in our study) or smoking (in Kremer's study), but not with dependency levels or smoking characteristics. Therefore, we may conclude as Kremer et al. [26] that this polymorphism influences the pathogenesis of tobacco use disorder or nicotine dependence.

Other studies showed that other genes related to tobacco use disorder may also modulate cessation attempts. Thus, one study tested the effects of genetic risk in a cohort that initiated smoking during adolescence progressed to daily smoking and progressed to heavy smokers and developed nicotine dependence. The authors examined the effects of the SNP of the q 25.1 region of chromosome 15 containing the nicotinic cholinergic receptor *CHRNA5*, *CHRNA3*, *CHRNA4* gene cluster. Genetic risk score was related to individuals who were more likely to develop nicotine dependence and were more likely to fail in their cessation attempts [3]. In addition, serum cotinine levels were associated with a *CHRNA* genetic polymorphism [49]. Genome wide association studies of tobacco addiction have also identified genes that affect smoking initiation, these genes being associated with a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) polymorphism on chromosome 11 [50]. These findings are consistent with the idea that different genes are associated with the development and progression of smoking behavior from initiation, nicotine dependence, daily smoking to smoking cessation.

The results of this study add to the knowledge that tobacco use disorder is a complex behavior that includes polygenic risk. Several regions across the genome have been implicated in containing genes that confer liability to tobacco use disorder or nicotine dependence and variation in individual genes has been associated with nicotine dependence. Regarding the interplay between genetic and environmental influence on the etiology of nicotine dependence, studies of twins found that 50% of the risk of nicotine dependencies was genetically transmitted [51]. More specifically, the *STin2.12* allele may be a transcriptional enhancer associated with an increased susceptibility to substance abuse [28]. There is evidence that the *STin2.12* allele may have a higher transcriptional activity than the 10-repeat allele [38] and that *STin2.12* allele homozygotes show lowered serotonin availability [30]. Nicotine is known to increase the release and signaling of serotonin [52,53]. This may suggest that disorders in 5-HTT functioning and 5-HT signaling may play a role in nicotine dependence or withdrawal [52]. Antidepressants, such as selective serotonin reuptake inhibitors, have, however no efficacy in quitting smoking [54]. In a brain imaging study, there were no associations between *STin2* genetic polymorphism and the availability of the 5-HTT in different brain regions [55].

Nevertheless, smoking causes activated immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways [15,34-36]. Activated IO&NS pathways, in turn, may induce indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) leading to increased levels of tryptophan catabolites (TRYCATs), including kynurenine [56], and lowered levels of tryptophan and thus serotonin [37].

Therefore the lowered availability of serotonin associated with the *STin2.12* allele may be aggravated by smoking-induced IDO activation. Such IO&NS and IDO responses are strongly related to depression and depressive symptoms in patients with tobacco use disorders [56,57]. Nicotine abuse may then be regarded as an operationally conditioned response that counteracts depleted serotonin levels thus preventing the adverse effects of lowered serotonin. Smoking-induced activation of IO&NS pathways may further endanger serotonin metabolism thereby maintaining nicotine abuse and thus tobacco use disorder. Therefore, it is likely that the 5-HTT genes may contribute to the development of tobacco use disorder or nicotine dependence among individuals who are prone to mood disorders or have a lower educational level. In addition, the effects of nicotine use on serotonin, and smoking- and *STin2*-related changes in the IO&NS-serotonin nexus may activate (neuro)degenerative pathways related to dysfunctions in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, microglial activation, mitochondrial dysfunctions, decreased levels of antioxidants, damage to lipids, proteins, and DNA leading to autoimmune responses against multiple neoantigens [56,57]. Future research should examine the relationships between IO&NS pathways and serotonin signaling in tobacco use disorder and nicotine-dependence.

A third major finding is that no significant association could be established between *STin2* polymorphism and alcohol use and sedative use risk. Nevertheless, *STin2* polymorphism was associated with tobacco use disorder and tobacco use disorder with increased alcohol and sedative use risk. This may indicate that the *STin2* VNTR polymorphism in the *SLC6A4* gene could influence an individual's vulnerability to develop tobacco use disorder rather than a substance use disorder. Phrased differently, the *STin2.12* allele and *STin2.10/10* genotype may be specifically associated with tobacco use disorder. However, we used the ASSIST scale to measure increased risk to alcohol and sedative use rather than DSM IV diagnostic criteria and therefore the results should be checked using DSMV criteria of substance abuse disorder.

The results of this study should be interpreted with regard to its strengths and limitations. Firstly, the present study design was a case-control study and therefore our results can only delineate associations and not causality. Secondly, our sample included smokers who had sought smoking cessation treatment, while women are more likely to seek assistance for smoking cessation than men. Therefore, our sample may not be representative of the general population. Thirdly, the age of our sample ranged from 18 to 65 years old and therefore our findings cannot be generalized to older or younger population. Fourthly, in this study we did not examine other polymorphisms in the *SLC6A4* gene.

Conclusions

Our findings provide some evidence that a lower frequency of the STin2.10/10 genotype and a higher frequency of the STin2.12 allele are more frequent among individuals with current tobacco use disorder than in never-smokers, suggesting that this 5-HTT polymorphism is related to the serotonergic pathophysiology of tobacco use disorder and nicotine dependence and the consequences of smoking activating IO&NS pathways. The 5-HTT polymorphism does not appear to be a major determinant of smoking cessation or smoking characteristics, suggesting that this polymorphism is related to the pathogenesis of tobacco use disorder or nicotine dependence. This 5-HTT polymorphism may be more specific to tobacco use disorder rather than to substance abuse disorder. The translational implications of these findings include the identification of subgroups of patients with current tobacco use disorder, for example, those with a serotonergic pathophysiology and those who are more at risk to develop mood disorders. Elucidating the influence of the 5-HTT gene polymorphism is important among patients with current tobacco use disorder because smoking may reinforce the dysfunctions in serotonergic signaling through induction of IO&NS pathways.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors participated in its design, reviewed drafts of the manuscript and approved the final version before submitting for publication.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Centre of Approach and Treatment for Smokers, Molecular Genetics Laboratory, and Clinical Immunology section of Clinical Analysis Laboratory of University Hospital of Londrina State University, Paraná, Brazil (UEL).

MB is supported by a NHMRC Senior Principal Research Fellowship 1059660. MM is supported by a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) PVE fellowship and the Health Sciences Graduate Program fellowship, Londrina State University (UEL).

This study was supported by Health Sciences Postgraduate Program at Londrina State University, Paraná, Brazil (UEL) and Araucária Foundation.

Author details

¹Center of Approach and Treatment for Smokers, University Hospital, Londrina State University, Campus Universitário/Cx, Postal 600, Londrina, Paraná ZIP 86051-990, Brazil. ²IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia. ³Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. ⁴Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Brazil. ⁵Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Centre, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil. ⁶Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil. ⁷Orygen Youth Health Research Centre, Centre for Youth Mental Health, Department of Psychiatry and the Florey Institute for Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Australia. ⁸Barwon Health and the Geelong Clinic, Swanston Centre, Geelong, Victoria 3220, Australia.

Received: 10 December 2013 Accepted: 18 June 2014
 Published: 27 June 2014

References

- Ezzati M, Lopez AD: Estimates of global mortality attributable to smoking 2000. *Lancet* 2003, **362**:847–852.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray C: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006, **367**:1747–1757.
- Belsky D, Moffitt T, Baker T, Biddlem A, Evans J, Harrington H, Houts R, Meier M, Sugden K, Williams B, Poulton R, Caspi A: Polygenic risk and the developmental progression to heavy, persistent smoking and nicotine dependence. *JAMA Psychiatry* 2013, **70**(5):534–542.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Quitting smoking among adults: United States, 2001–2010. *Morb Mortal Wkly Rep* 2011, **60**(44):1513–1519.
- American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th edition. Washington, DC: Author, American Psychiatric Publishing; 2013.
- Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D: Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets* 2006, **7**:1659–1669.
- Alves de Lima K, Guembarovski R, Oda J, Ramos G, Oliveira B, Cavalli I, Ribeiro E, Gonçalves M, Aoki M, Nunes SOV, Watanabe MAE: Association between the STin2 VNTR polymorphism and smoking behavior in oral cancer patients and healthy individuals. *Clin Exp Med* 2012, **12**:13–19.
- Brody LC, Hamer HD, Haaga DAF: Depression vulnerability, cigarette smoking, and the serotonin transporter gene. *Addict Behav* 2005, **30**:557–566.
- Tsuang MT, Francis T, Minor K, Thomas A, Stone WS: Genetics of smoking and depression. *Hum Genet* 2012, **131**(6):905–915.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, Mc Clay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R: Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003, **301**:386–389.
- Lerman C, Caparaso N, Audrain J, Main D, Boyd N, Shields P: Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoking practices and nicotine dependence. *Mol Psychiatry* 2000, **5**:189–192.
- Lerman C, Shields P, Audrain J, Main D, Cobb B, Boyd N, Caparaso N: The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998, **7**:253–255.
- Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin Y-L, Yanagi H, Tsuchiya S, Kawata K-i, Hamaguchi H, Arinami T: Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking japonese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999, **8**:831–833.
- Hu S, Brody CL, Fisher C, Gunzerath L, Nelson ML, Sabol SZ, Sirota LA, Marcus SE, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH: Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Mol Psychiatry* 2000, **5**(2):181–188.
- Nunes SOV, De Castro MRP, Vargas HO, Vargas MM, Bueno RRM, Fonseca ICB, Dodd S, Berk M: Clinical characteristics and smoking cessation: an analysis of sex and depressive disorders differences. *Addict Disord Their Treat* 2013, **12**(3):158–165.
- Munafò MR, Johnstone EC, Mackintosh B: Association of serotonin transporter genotype with selective processing of smoking-related stimuli in current smokers and ex-smokers. *Nicotine Tob Res* 2005, **7**(5):773–778.
- Munafò MR, Johnstone EC, Wileyto EP, Shields PG, Elliot KM, Lerman C: Lack of association of 5-HTTLPR genotype with smoking cessation in a nicotine replacement therapy randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**(2):398–400.
- Skowronek MH, Laucht M, Hohm E, Becker K, Schmidt M: Interaction between the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter promoter polymorphisms in alcohol and tobacco use among 15-year-olds. *Neurogenetics* 2006, **7**:239–246.
- Trummer O, Köppel H, Wascher TC, Grünbacher G, Gutjahr M, Stanger O, Ramschak-Schwarzer S, Boehm BO, Winkelmann BR, März W, Renner W: The serotonin transporter gene polymorphism is not associated with smoking behavior. *Pharmacogenomics J* 2006, **6**:397–400.
- David SP, Munafò MR, Murphy MFG, Walton RT, Johnstone EC: The serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism and treatment response to nicotine patch: Follow-up of a randomized controlled trial. *Nicotine Tob Res* 2007, **9**(2):225–231.
- Han D-H, Joe K-H, Na C, Lee Y-S: Effect of genetic polymorphisms on smoking cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers. *Psychiatr Genet* 2008, **18**:11–16.

22. Sieminska A, Buczkowski K, Jassen E, Tkacz E: **Lack of association between serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR and smoking among Polish population: a case-control study.** *BMC Med Genet* 2008, **9**:76.
23. Watanabe MAE, Nunes SOV, Amarante MK, Guembarovski RL, Oda JMM, Lima KWAD, Fungaro MHP: **Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR: involvement in smoking behaviour.** *J Genet* 2011, **90**:179-185.
24. Ishii T, Wakabayashi R, Kurosaki H, Gemma A, Kida K: **Association of serotonin transporter gene variation with smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and its depressive symptoms.** *Am J Hum Genet* 2011, **56**:41-46.
25. Yang Z, Seneviratne C, Wang S, Ma JZ, Payene TJ, Wang J, Li MD: **Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European American and African smokers.** *Drug Alcohol Depend* 2013, **129**:217-225.
26. Kremmer I, Bachner-Melman R, Reshef A, Broude L, Nemanov L, Gritsenko I, Heresco-Levy U, Elizur Y, Ebsstein RP: **Association of the serotonin transporter gene with smoking behavior.** *Am J Psychiatry* 2005, **162**(5):924-930.
27. Mrazek DA: *Psychiatric Pharmacogenomics*. New York: Oxford University Press; 2010.
28. Herman A, Balogh K: **Polymorphisms of the serotonin transporter and receptor genes: susceptibility to substance abuse.** *Subst Abuse Rehabil* 2012, **20**(2-3):49-57.
29. Iordanidou M, Tavidou A, Petridis I, Kyroglou S, Kklamanis L, Christakidis D, Manolopoulos VG: **Association of polymorphisms of the serotonergic system with smoking initiation in Caucasians.** *Drug Alcohol Depend* 2010, **108**:70-76.
30. Sarosi A, Gonda X, Balogh G, Domotor E, Szekeley A, Hejjas K, Sasvari-Szekeley M, Faludi G: **Association of the STin2 polymorphism of the serotonin transporter gene with a neurocognitive endophenotype in major depressive disorder.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008, **32**:1667-1672.
31. Fan JB, Scalar P: **Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia.** *Mol Psychiatry* 2005, **10**:928-938.
32. Castro MRP, Matsuo T, Nunes SOV: **Clinical characteristics and quality of life of smokers at a referral center for smoking cessation.** *J Bras Pneumol* 2010, **36**(1):67-74.
33. Castro MRP, Matsuo T, Nunes SOV: **Characteristics of smokers in smoking cessation interventions: an analysis of sex differences.** *Addict Disord Their Treat* 2010, **9**(4):135-142.
34. Nunes SOV, Vargas HO, Brum J, Prado E, Vargas MM, De Castro MRP, Dodd S, Berk M: **A comparison of inflammatory markers in depressed and non-depressed smokers.** *Nicotine Tob Res* 2012, **14**:540-546.
35. Vargas HO, Nunes SOV, De Castro MRP, Bortolasci CC, Barbosa DS, Morimoto HK, Venugopal K, Dodd S, Maes M, Berk M: **Oxidative stress and lowered total antioxidant status are associated with history of suicide attempts.** *J Affect Disorders*. in press.
36. Vargas HO, Nunes SOV, De Castro MRP, Vargas MM, Barbosa DS, Bortolasci CC, Venugopal K, Dodd S, Berk M: **Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence.** *Neurosci Lett* 2013, **544**:136-140.
37. Malone KM, Waternaux C, Haas GL, Cooper TB, Li S, Mann JJ: **Cigarette smoking, suicidal behavior, and serotonin function in major psychiatric disorders.** *Am J Psychiatry* 2003, **160**:773-779.
38. Bah J, Lindström M, Westberg L, Mannerås L, Ryding E, Henningson S, Melke J, Rosén I, Tråskman-Bendz L, Erikson E: **Serotonin transporter gene polymorphisms: effects on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters.** *Psychiatry Res* 2008, **162**:221-229.
39. Quak M, Schayck CP, Knaapen AM, Schooten F: **Genetic variation as a predictor of smoking cessation success. A promising preventive and intervention tool for chronic respiratory diseases?** *Eur Respir J* 2009, **33**:468-480.
40. Del Ben CM, Vilela JAA, Crippa JAS, Hallak JEC, Labate CM, Zuardi AW: **Confiabilidade da "entrevista clínica estruturada para o DSM-IV" - versão clínica traduzida para o português.** *Rev Bras Psiquiatr* 2001, **23**(3):156-159.
41. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): **Cigarette smoking in the United States: current cigarette smoking among U.S. adults aged 18 years and older.** 2009. <http://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/resources/data/cigarette-smoking-in-united-states.html>.
42. Fagerström KO, Schneider NG: **Measuring nicotine dependence: a review of the Fagerström Tolerance Questionnaire.** *J Behav Med* 1989, **12**:159-182.
43. Carmo JT, Pueyo AA: **A adaptação ao português do Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) para avaliar a dependência e tolerância à nicotina em fumantes.** *Rev Bras Med* 2002, **59**(1/2):73-80.
44. Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CMC, Godoy I, Chatkin JM, Sales MPU, Santos SRR SRR: **Diretrizes para cessação do tabagismo - 2008. Smoking cessation guidelines - 2008.** *J Bras Pneumol* 2008, **34**(10):845-880.
45. Middleton ET, Morice AH: **Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit.** *Chest* 2000, **117**(3):758-763.
46. Ministério da Saúde (Brasil): *Secretaria de Atenção à Saúde, Portaria SAS/MS 442/04 de 13 de agosto de 2004. Aprova o Plano de Implantação da Abordagem e Tratamento do Tabagismo no SUS. D.O.U n° 158 17/08/2004. Brasília, DF.* Retrieved from: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/PT-442.htm>.
47. Nunes SOV, Vargas HO, Castro MR, Machado RCB, Carmo DR: **Abordagem intensiva.** In *Abordagem, Prevenção e Tratamento do Tabagismo*. Edited by Nunes SOV, Castro MRP. Londrina: Edel; 2011:97-216.
48. World Health Organization (WHO): **The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility.** *Addiction* 2002, **97**(9):1183-1194.
49. Keskitalo K, Broms U, Heliövaara M, Ripatti S, Surakka I, Perola M, Pitkaniemi J, Peltonen L, Aromaa A, Kaprio J: **Association of serum cotinine level with a cluster of three nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA3/CHRNA5/CHRNA4) on chromosome 15.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**:4007-4012.
50. The Tobacco and Genetics Consortium: **Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior.** *Nat Genet* 2010, **42**(5):441-447.
51. Lessov-Schlaggar CN, Pergadia ML, Khroyan TV, Swan GE: **Genetics of nicotine dependence and pharmacotherapy.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**:178-195.
52. O'Loughlin J, DiFranza J, Tyndale RF, Meshefedjian G, McMillan-Davey E, Clarke PB, Hanley J, Paradis G: **Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents.** *Am J Prev Med* 2003, **25**(3):219-225.
53. Hernandez-Lopez S, Garduño J, Mihailescu S: **Nicotinic modulation of serotonergic activity in the dorsal raphe nucleus.** *Rev Neurosci* 2013, **24**:455-469.
54. Hughes JR: **Smoking and suicide: a brief overview.** *Drug Alcohol Depend* 2008, **98**:169-178.
55. Ho P-S, Ho KK-J, Huang W-S, Yen C-H, Shih M-C, Shen L-H, Ma K-H, Huang S-Y: **Association study of serotonin transporter availability and SLC6A4 gene polymorphisms in patients with major depression.** *Psychiatry Res* 2013, **212**:216-222.
56. Maes M, Chang YS, Galecki P, Berk M: **A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011, **35**:676-692.
57. Nunes SOV, Vargas HO, Prado E, Barbosa DS, Melo LP, Moylan S, Dodd S, Berk M: **The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence.** *Neurosci Biobehav Rev* 2013, **37**:1336-1345.

doi:10.1186/1471-2156-15-78

Cite this article as: Pizzo de Castro et al.: *SLC6A4 STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with tobacco use disorder, but not with successful smoking cessation or smoking characteristics: a case control study.* *BMC Genetics* 2014 **15**:78.

5.2 ARTIGO 2

STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid tobacco use and mood disorders.

Márcia Regina Pizzo de Castro BSN, M.S.^a, Sandra Odebrecht Vargas Nunes, M.D., Ph.D.^{a,b}
Roberta Losi Guembarovski, Ph.D.^c, Carolina Batista Ariza, Ph.D.^c, Julie Massayo Maeda
Oda, Ph.D.^c, Heber Odebrecht Vargas, M.D., Ph.D.^{a,b}, Luiz Gustavo Piccoli de Melo, M.D.^a,
Maria Angelica Ehara Watanabe Ph.D.^c, Michael Berk M.D., Ph.D.^{d,e,f}, Michael Maes, M.D.,
Ph.D.^{d,g,h}

^a Center of Approach and Treatment for Smokers, University Hospital, Londrina State University, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil

^b Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, Londrina State University, University Hospital, Londrina, Paraná, Brazil

^c Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Centre, Londrina State University, Paraná, Brazil

^d IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

^e Orygen Youth Health Research Centre, Centre for Youth Mental Health, Department of Psychiatry and the Florey Institute for Neuroscience and Mental Health, University of Melbourne, Parkville, Australia.

^f Barwon Health and the Geelong Clinic, Swanston Centre, Geelong, Victoria, Australia

^g Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Faculty of Medicine, Bangkok, Thailand.

^h Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Brazil.

Corresponding author:

Prof. Dr. Michael Maes, M.D., Ph.D.

Center of Approach and Treatment for Smokers

Londrina, Paraná

ZIP 86055-630

Brazil

Phone: +55-43-33368058

Fax: +55-43-33480990

E-mail: dr.michaelmaes@hotmail.com

mpizzo@sercomtel.com.br

<http://scholar.google.com.br/citations?user=1wzMZ7UAAAAJ&hl=pt-BR&oi=ao>

Abstract.

Background: There is a significant comorbidity between mood disorders and tobacco use disorder (TUD), which may be related to both genetic and environmental factors. Gene variants of the 5-HT transporter, such as STin2 VNTR (a variable number of tandem repeats in the functional serotonin transporter intron 2) may be associated with mood disorders and TUD.

Aims: This study aimed to delineate the association between the STin2 genetic polymorphism and comorbid TUD and mood disorders, including depression or bipolar disorder.

Methods: We examined the STin2 VNTR polymorphism in never-smokers (n=113); patients with mood disorders without TUD (n=62); patients with TUD without mood disorders (n=90); and patients with both disorders (n=95).

Results: We found a significant association between the STin2 genetic polymorphism and the above diagnostic groups whereby the STin2.12 allele shows a positive association with comorbid TUD and mood disorders (Odds ratio=3.07, 95% CI=1.41-6.68), while the STin2.10/10 homozygous genotype shows a negative association (Odds ratio=0.34, 95% CI=0.16-0.74). Adjusting for years of education, age, gender, marital status and ethnicity did not change these results, but showed that TUD was associated with lower education levels and less stable relationships, whereas mood disorders were related to female gender. A family history of TUD was significantly associated with TUD in subjects without mood disorders only.

Conclusions: The STin2.12 allele is positively and the STin2.10/10 genotype is negatively associated with comorbid TUD and mood disorders, depression or bipolar depression, suggesting that biological endophenotypes, e.g. disorders in serotonin metabolism, may in part underpin this comorbidity.

Key words: mood disorders, tobacco use disorder, genetic polymorphism, serotonin transporter, oxidative stress, inflammation

Background

Many studies have reported on the comorbidity between mood disorders and tobacco use disorder (TUD) (Patton et al., 1998; Lasser et al., 2000; Glassman et al., 2001; Murphy et al., 2003; Klungsøyr et al., 2006; Ziedonis et al., 2008; Pasco et al., 2008; Berlin et al., 2009; Pedersen and von Soest, 2009; Boden et al., 2010; Flensburg–Madson et al., 2011; Jamal et al., 2012; Goodwin et al., 2013). Estimates of the prevalence rate of current TUD among individuals with major depressive disorder and bipolar disorder range from 40% to 60% and 50% and 65%, respectively (Anthenelli, 2014). TUD is associated with an increased risk of depressive disorders, including suicide (Malone et al., 2003; Breslau et al., 2005; McGee et al., 2005; Hughes et al., 2008; Goodwin et al., 2012). Increased depression or current TUD rates may elevate the vulnerability for the other disease (Audrain-McGovern et al., 2009).

Potential mechanisms underlying the relationship between TUD and mood disorders, either bipolar disorder or depression, may be explained by common risk factors, including environmental and genetic factors or gene by environmental interactions (Heffener et al., 2011; Kendler et al., 1993; Lyons et al., 2008; McCaffery et al., 2008; Tsuang et al., 2012). Likewise, the comorbidity between both disorders is thought to be determined at least in part by neurobiological endophenotypes (Tsuang et al., 2012). Shared candidate genes for mood disorders and TUD have been identified, including genes that encode catechol-O-methyltransferase (COMT) and the dopamine and serotonin (5-HT) transporter (McEachin et al., 2010). Recently, we reported that significant interactions between antioxidant genes (PON1 Q192R functional genotypes) and current TUD predict mood disorder subtypes (Bortolasci et al., 2014).

Disorders in serotonin (5-HT) metabolism are evident in patients with depression and mood disorders (Maes and Meltzer, 1995; Seretti et al., 2006), while polymorphisms in genes encoding the serotonin transporter (5-HTT) may modulate the susceptibility to mood

disorders and TUD (Serretti et al., 2006). The *SLC6A4* gene, mapped on chromosome 17, encodes the 5-HTT (Lesch et al., 1994) and a polymorphism in the promoter region of the *SLC6A4* gene was used to characterize genetic vulnerability to mood disorders (Caspi et al., 2003, Kaufman et al., 2004, Risch et al., 2009) and TUD (Lerman et al., 1998; 2000; Ishikawa et al., 1999; Hu et al., 2000; Eddahibi et al., 2003; Brody et al., 2005; Kremer et al., 2005; Munafò et al., 2005; 2006; Skowronek et al., 2006; Trummer et al., 2006; David et al., 2007; Han et al., 2008; Sieminska et al., 2008; Watanabe et al., 2011; Ishii et al., 2011; Tsuang et al., 2012; Yang et al., 2013).

A genetic polymorphism of STin2 VNTR (a variable number of tandem repeats in the 5-HTT intron) shows two major alleles, i.e. STin2.10 and STin2.12, corresponding to 10 and 12 repeat units of the 17-bp (Ali et al., 2010; Sarosi et al., 2008). The STin2.12 allele may show a higher transcriptional activity than the 10-repeat allele, while STin2.12 allele homozygotes might have a tendency to a lowered serotonin availability (Bah et al., 2008; Sarosi et al., 2008). There are some reports that the STin2 VNTR genetic polymorphism is associated with bipolar disorder (Kunugi et al., 1997) or cognitive dysfunction in depression (Sarosi et al., 2008). There is also a possible association between the VNTR polymorphism and TUD (Alves de Lima et al., 2012). However, the association between the STin2 VNTR polymorphism and comorbid mood disorders and TUD has remained elusive.

The purpose of this study was to delineate whether the STin2 VNTR polymorphism is associated with comorbid mood and TUD. Therefore, we examined the STin2 VNTR polymorphism in four mutually exclusive study groups, i.e. 1) subjects without mood disorders and without tobacco use disorder; 2) patients with mood disorders but without tobacco use disorder; 3) patients with tobacco use disorder but without mood disorders; and 4) patients with comorbid mood disorders and tobacco use disorder. We hypothesized that this

genetic variant would be associated with groups 2 and 3 and especially with group 4 based on prior literature.

2. Subjects and methods

2.1. Study population

In this cross-sectional, case-control study, we included participants recruited from the outpatient Centre of Approach and Treatment for Smokers and from staff at Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil. All participants were women and men aged 18-65 years. We included all ethnicities and individuals with and without mood disorders, i.e. major depression and bipolar disorder, and with and without TUD. Participants were divided into four mutually-exclusive groups: 1) never-smokers (that is without current or lifetime TUD) and without mood disorders (n=113); 2) never-smokers who suffered from mood disorders (n=62); 3) individuals with the diagnosis of TUD but without mood disorders (n=90); and 4) individuals with comorbid TUD and mood disorders (n=95). We excluded subjects with a life-time diagnosis of axis-I disorders other than major depression and bipolar disorder, such as psychosomatic disorders, psycho-organic syndromes, schizophrenia, etc. The axis I diagnoses were made by a trained clinician using the semi-structured DSM-IV interview (SCID) using a validated Portuguese translation (Del Ben et al., 2001). Patients diagnosed with major depression (n=112) and bipolar disorder (n=45) were allocated to the group "mood disorders". Never-smokers according to US Centers for Disease Control and Prevention criteria (CDC, 2010) who had never smoked any cigarette were allocated to the study sample "no TUD". In our study we included only participants with active TUD who were also current smokers.

A translated and validated version of the 21-item Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (Hamilton, 1960), adapted to the Brazilian cultural context and translated into

Portuguese language (Moreno and Moreno, 1998), was used to measure severity of depression. A structured questionnaire was used to gather information on socio-demographic characteristics, including age, gender, self-reported ethnicity (Caucasian, African, Asian, mixed), marital status (single; stable relationship or married; and separated, divorced or widowed); years of education; employment status (employed or student; unemployed; and disabled to work); family history of tobacco use disorder and family history of treatment for psychiatric disorders (both in first-degree relatives, that is sibling, parents, sons, and daughters). The body mass index (BMI) was calculated as body weight (kg) divided by squared body height in meters (m²). The study was conducted between March 2011 and July 2012. All subjects had given written informed consent to participate in the study after the approval of this research by the Ethics Research Committee at Londrina State University (UEL), number 037 /2011.

2.2. Genetic assessments: DNA extraction and polymorphism detection

Peripheral blood samples were obtained with EDTA as anticoagulant from all participants. Genomic DNA was extracted from 200 µL of peripheral blood cells using the Biopur Kit (Biometrix Diagnostic, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The DNA pellet was re-suspended in 50 µL of Biopur Kit specific buffer, quantified by spectrophotometry, and stored in a -20°C freezer until use in genotyping analyses. Allelic specific polymerase chain reaction (AS-PCR) for STin2 VNTR polymorphism detection was realized with genomic DNA (100 ng) with specific primers described by Klauck et al. (1997) as follows: forward primer — 5'TGGATTTTCCTTCTCTCAGTGAATTGG3' and reverse primer — 5'TCATGTTTCCTAGTCTTACGCCAGTG3'. Samples were amplified using the kit buffer plus 1.25 units Taq polymerase (Invitrogen TM, Carlsbad, California). PCR conditions were:

5 min denaturation at 94°C, 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C, and 20 min elongation at 72°C in a Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplicons were analyzed by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel and detected by a non radioisotopic technique using a commercially available silver staining method. **Figure 1** shows the electroforetic profile of STin2 VNTR.

2.3. Statistical analyses

We used analyses of contingency tables (χ^2 -test) or the exact Fisher test (with the P coefficient of association) to ascertain differences in socio-demographic and clinical data between study groups. We employed analysis of variance (ANOVA) to assess the differences in continuous socio-demographic and clinical variables between groups. Post-hoc analyses were performed using the Tukey test. We did not use a p-correction to examine the results of multiple univariate analyses because we used the results of these analyses to define the relevant explanatory variables that were subsequently used as determinants of independent association with the diagnostic groups in the ultimate multivariate analyses. Multinomial regression analyses were employed to examine the associations between the diagnostic groups (dependent variables) and the genotypic or allelic distributions and clinical / socio-demographic data (explanatory variables). The control group, that is never-smokers (no TUD and no mood disorders) was the reference group and was compared with each of the three other diagnostic groups. Exploratory (structure detection) factor analysis was used to interpret the associations between diagnostic groups (mood disorders and TUD), genetic polymorphism and relevant socio-demographic and clinical data. Varimax rotation of the subtracted principal components was used to interpret the data. The number of factors is based on eigenvalues > 1 . Power analysis showed that at a lower effect size of 0.17 and given $\forall=0.05$, power=0.8 and df=3, we should include around 378 subjects (GPower.3.1). We

analyzed the data using SPSS and Statistica. All tests were 2-tailed and statistical significance was set at $\alpha=0.05$.

3. Results

3.1. Socio-demographic and clinical characteristics

Table 1 shows the socio-demographic and clinical characteristics of the 4 study groups, i.e. 1) never-smokers without mood disorders (the controls); 2) never-smokers with mood disorders; 3) TUD subjects without mood disorder; 4) patients with comorbid mood disorders and TUD. Without p-correction, there were marginal but significant differences in age between the groups: group 3 patients were older than controls (Tukey test: $p=0.003$). There were significantly more females in the mood disorder groups ($\chi^2=17.8$, $df=1$, $p<0.001$). There were no significant associations between the diagnostic groups and ethnicity, marital status, BMI, and family history of psychiatric disorders between the 4 study groups. Patients with TUD had significantly less years of education but more unemployment and disability support than those without TUD. There were significant differences in the HDRS score between the 4 study groups and the score increased from group 1 \rightarrow group 3 \rightarrow group 2 \rightarrow group 4 (all pairwise comparisons were significant). There were significant differences in TUD family history between the groups with significant differences (at $p<0.05$) between the controls and patients with TUD with or without mood disorders. In the controls there was a significant departure from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for the STin2 VNTR polymorphism ($\chi^2=24.8$, $p<0.001$; χ^2 test for 3 alleles with Yates correction for a small sample size).

3.2. STin2 VNTR polymorphisms and the diagnostic groups.

Table 2 shows the association between the STin2 allelic and genotypic distributions and the 4 groups, while **Table 3** shows the outcome of multinomial regression analyses

(results of Π^2 tests, contrasts between all three patient groups and controls, and Odds ratio with 95% CI intervals). There was a significant association between the STin2.12 allele and the diagnostic groups. Analyses of the parameter estimates shows that the frequency of the STin2.12 allele was significantly higher in group 4 compared with controls, while there were no significant differences between groups 1 and 2 and controls. Moreover, the STin2.12 allele frequency was significantly higher in groups 3 ($p=0.041$) and 4 ($p=0.001$) than group 2, while there were no significant differences between groups 4 and 3 ($p=0.160$). The frequency of the STin2.10/10 genotype was significantly lower in group 4 compared with controls, while no such significant differences were found between groups 1 and 2 and controls. Moreover, STin2.10/10 genotype frequency was significantly lower in groups 3 ($p=0.041$) and 4 ($p=0.001$) than in group 2, while there were no significant differences between groups 4 and 3 ($p=0.160$).

Table 4 shows the results of multinomial logistic regression analyses with the diagnostic groups as dependent variables and the STin2.12 alleles or genotypes and the socio-demographic or clinical data as additional explanatory variables. Considering the STin2 alleles, we found that there were three significant explanatory variables, i.e. the STin2.12 allele, years of education and gender. Female gender is significantly associated with group 2, years of education with groups 3 and 4 and the STin2.12 allele with group 4. Considering the STin2 genotypes, we found three significant explanatory variables, i.e. STin2.10/10 genotype (associated with group 4 only), years of education and gender. We also controlled for possible effects of ethnicity, marital status, family history of psychiatric disorders and family history of TUD. Forced entry of these additional explanatory variables in the analysis did not change the association between the diagnostic groups and STin2.12 allele or STin2.10/10 genotype as reported in Tables 3 and 4.

In order to further delineate the interaction between mood disorders and TUD we examined the cross-tabulation with the crosstabs procedure. **Table 5** shows that when using mood disorder as the layer factor, TUD in the rows and the genetic variables in the columns, significant associations were detected that could not be found when TUD was used as a layer factor. There are significant associations (computed as phi coefficients for nominal by nominal associations) between STin2.12 allele and comorbid TUD in subjects with (phi=0.270, p=0.001), but not without (phi=0.14, p=0.138) mood disorders. Using TUD as a layer variable showed that there was no significant association between mood disorders and STin2.12 allele in subjects with (phi=0.104, p=0.156) or without (phi=0.060, p=0.424) TUD. There was also a significant association between STin2.10/10 genotype and TUD in patients with (phi=0.270, p=0.001), but not without (phi=0.094, p=0.179) mood disorders. Using TUD as a layer variable showed that there was no significant association between mood disorders and STin2.10/10 genotype in subjects with (phi=0.104, p=0.156) or without (phi=0.070, p=0.353) TUD. Table 5 also shows that in patients without mood disorders there was a significant association between TUD and a family history of TUD (phi=0.208, p=0.003). This association was not significant in subjects with mood disorders (phi=0.142, p=0.075).

We also performed two different factor analyses performed on the STin2.12 allele or the STin2.10/10 genotype and TUD, mood disorders, age and years of education. When including the STin2.12 allele as a variable we found two principal components, i.e. the first explaining 32.1% of the variance and loading on TUD (0.769), age (0.585) and years of education (-0.815), and the second explaining 22.5% of the variance and loading on STin2.12 allele (0.651), TUD (0.363), mood disorders (0.647) and age (-0.375) (shown are the loadings on the varimax rotated component matrix). When including the STin2.10/10 genotype as variable we found two principal components, i.e. the first explaining 32.1% of the variance and loading on TUD (0.771), age (0.583) and years of education (-0.816), and the second

explaining 22.4% of the variance and loading on STin2.10/10 genotype (0.643), TUD (-0.318), mood disorders (-0.648) and age (-0.382).

3.3. Associations with depression and bipolar disorder.

We have also examined possible differences between depression versus bipolar disorder. There were no significant differences in STin2.12 allele (31/4 versus 53/6) and STin2.10/10 genotype (4/31 versus 6/53) frequencies between patients with TUD + bipolar disorder versus TUD + depression (both $p=1.00$ by Fisher test). For example, the observed STin2.10/10 genotype frequencies are 46.8% lower in patients with TUD + bipolar disorder ($p=0.048$, by Fisher test) and 51.3% in TUD + depression ($p=0.009$) compared to all other subjects. We used cross-tabs analysis to assess relationships between subjects divided into those with depression versus bipolar disorder versus all other subjects (the layer factor), the STin2 alleles/genotypes (in column) and TUD (in row). In depressed ($\chi^2=7.26$, $df=1$, $p=0.007$) and bipolar ($\chi^2=4.64$, $df=1$, $p=0.039$) patients there were significant interactions between TUD and the STin2.12 allele with an increased prevalence of the allele in patients with TUD + depression (53/90 versus 6/22) and those with TUD + bipolar depression (32/37 versus 4/8). In the other subjects, however, there was no significant interaction between TUD and the alleles/genotypes. The same significant patterns were established for ST2in.10/10 genotype. Finally, we performed polynomial logistic regression analyses on 5 groups (i.e. group 1. normal controls without mood disorders or TUD; group 2. mood disorders without TUD; group 3. TUD but no mood disorders; group 4) BP with TUD; and group 5) depression with TUD) as dependent variable and the STin2 variables, gender and education as explanatory variables. We found a significant effect of the STin2.12 allele ($\chi^2=13.07$, $df=4$, $p=0.011$) and significant differences in STin2.12 allele frequency between controls and group 4 (Wald=4.08, $df=1$, $p=0.044$) and group 5 (Wald=6.30, $df=1$, $p=0.012$), but no significant

differences between controls and group 1 (Wald=2.58, df=1, p=0.108) and group 2 (Wald=0.94, df=1, p=0.333).

Based on the results of the multinomial regression, crosstab and principal component analyses we conclude that the STin2.12 allele is positively and the STin2.10/10 negatively associated with TUD in subjects with mood disorders (either bipolar disorder or depression) but not significantly in those without mood disorders. **Figure 2** shows a model that best fits these results.

4. Discussion

The current study demonstrates that patients with TUD and comorbid depression or bipolar disorder show a significant increased frequency of the STin2.12 allele and a lowered frequency of the STin2.10/10 genotype. These findings suggest that the STin2.12 allele increases risk to TUD with either depression or bipolar disorder, whereas the STin2.10/10 genotype shows a protective effect. Contrary to expectation, there were no significant changes in the frequencies of the STin2 alleles and genotypes in patients with TUD without mood disorders and in those with mood disorders without TUD. Interestingly, a family history of TUD was significantly associated with TUD in subjects without mood disorders (see Figure 2). Based on these results we hypothesize that there may be two distinct types of TUD, i.e. the first type is associated with mood disorders and the STin2 polymorphism, and the second type occurs independently from mood disorders and STin2 polymorphism but is associated with a TUD family history.

These findings extend those of previous reports showing that the comorbidity between depression / bipolar disorder and TUD may reflect shared neurobiological endophenotypes (Tsuang et al., 2012). Thus, common genetic familial factors may be related to a life history of TUD and depression (Kendler et al., 1993). In women, the correlation between depression

and smoking could be explained by common-genetic and non-shared environmental factors (McCaffery et al., 2008). In men, genetic effects may contribute to relationships between daily smoking and depression (Lyons et al., 2008). A familial vulnerability for depression is associated with smoking and TUD (Johnson et al., 2004). Therefore, we may conclude that STin2 VNRT may be one of the multiple genes that underpin the comorbidity between mood disorders and TUD. Moreover, our findings that a TUD family history is significantly associated with TUD in subjects without mood disorders suggest that other genes may contribute to TUD.

To the best of our knowledge no other studies have examined the effects of the STin2 genetic polymorphism on the co-occurrence of mood disorders and TUD and therefore our results are difficult to compare with previous results. Collier et al. (1996) reported that allele 12 increased the risk to bipolar disorder, i.e. 3.10 (95% CI 1.60-6.07) for homozygotes. Another study reported that STin2 VNTR polymorphism was significantly associated with bipolar disorder with an odds ratio of 2.2 (95% CI 1.2-4.0) (Kunugi et al., 1997). A significant excess of the 12 repeat allele was detected in bipolar probands using a one-tailed test with odds ratios for heterozygotes and homozygotes of 1.24 and 1.76, respectively (Rees et al., 1997). In a Spanish population, Gutiérrez et al. (1998) found an increased prevalence of STin2.10 carriers in melancholic depression with an odds ratio of 2.53 (95% CI, 1.21-5.34). Nevertheless, a meta-analysis was unable to find a significant association between the STin2 VNTR polymorphism and mood disorders, i.e. the odds ratios for alleles 9 and 10, compared with the common allele 12, were 1.05 (95% CI 0.56-1.95) and 0.90 (95% CI 0.77-1.05), respectively (Furlong et al., 1998). An excess of the STin2.9 allele in depression was associated with a susceptibility to major depression (Ogilvie et al., 1996), although other studies were unable to find any significant association between depression and the nine-repeat allele (Hoehe et al., 1998). However, these papers may be difficult to interpret. Thus,

depending on the higher number of people with TUD in an overarching mood disorder study sample one may find significant associations or no associations between mood disorders and the STin2 genotypes or alleles.

Alves de Lima et al. (2012) found more STin2.10 carriers in non-smokers as compared with smokers, showing that the STin2.10 allele may have a protective effect against smoking. In Brazilian patients with oral cancer, a significant association between the STin2 VNTR polymorphism and smoking behavior was found with STin2.9 carriers being in excess in smokers, whereas STin2.10 allele carriers were overrepresented in non-smokers (Alves de Lima et al., 2012). In childhood asthma no significant association was established between STin2 VNTR polymorphism and passive smoking (Farjadian et al., 2013).

We also detected that TUD was significantly inversely related to years of education and unemployment status, while mood disorders was associated with female gender. Previous reports found that individuals with a graduate degree showed a TUD prevalence rate of 5.7%, those with high school education a prevalence of 25%, whereas those with a general education level had a highly increased prevalence of 45.3% (Centers of Disease control and Prevention, 2009). The same study showed that people who were living in poverty had a much higher prevalence versus those who lived above the poverty level (Centers of Disease Control and Prevention, 2009). Females have a higher prevalence of depression than males, with a 70% greater risk for females (Kessler et al., 2003). In most countries the prevalence of smoking is higher in men than in women but this effect is in part mediated by differences in income (Tsuang et al., 2012).

Our findings that STin2.12 allele frequencies and STin2.10/10 genotypic distributions are associated with comorbid mood disorders and TUD may suggest that biological endophenotypes may in part determine this comorbidity. As explained in the Introduction, the 12 allele may result in a higher transcriptional activity than the 10-repeat allele. Mood

disorders are accompanied by alterations in brain serotonin metabolism, including the 5-HTT (Maes and Meltzer, 1995). Many effects of nicotine are mediated by an increased release of serotonin (O'Loughlin et al., 2003; Hernandez-Lopez et al., 2013). The effects of nicotine results in alterations in the activity of neurons in the Dorsal Raphe Nucleus which modulate 5-HT metabolism and signaling in the projecting brain regions (Hernandez-Lopez et al., 2013). In the rodent, reserpine-induced decreases in monoamines in the hippocampus and cortex are restored after administration of nicotine, suggesting that the antidepressant activities of nicotine are mediated through its effects on monoamines (Khadrawy et al., 2011). Therefore, nicotine-induced changes in the metabolism of serotonin could play a role in the mood changes related to nicotine withdrawal or nicotine dependence (O'Loughlin et al., 2003). On the other hand, selective serotonin reuptake inhibitors do not have clinical efficacy in quitting smoking (Hughes et al., 2014) and using single-photon emission computed tomography, no significant effects of STin.2 genetic polymorphisms were found on the availability of the 5-HTT in brain regions such as thalamus, midbrain, striatum and pons (Ho et al., 2013).

Other processes that may underpin the comorbidity between the functional STin2 genetic polymorphism and the comorbidity between mood disorders and TUD are activated immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways (Leonard and Maes, 2012; Berk et al., 2013; Nunes et al., 2013). Activated IO&NS pathways may further endanger serotonin pathways through induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (Maes et al., 1993). A lowered availability of serotonin could further endanger the IO&NS pathways as serotonin is an anti-inflammatory and antioxidative compound (Maes et al., 2011). All in all, lowered serotonin metabolism could underpin the pathophysiology of mood disorders and STin2-related TUD; smoking behavior is maintained through the serotonergic and antidepressant effects of nicotine; while smoking-induced activation of IO&NS pathways may aggravate depression and further endanger serotonin metabolism thereby maintaining TUD.

Our study has a number of strengths and limitations. Firstly, the diagnosis of TUD and never-smokers were made using specific DSM and CDC criteria, which were not often used in previous research. Secondly, we have included validated clinical assessments of smoking characteristics, including severity of nicotine dependence, age at onset and duration of illness. On the other hand, positive results obtained in case-control studies may be based on spurious associations caused by population stratification or selection bias (Moskvina et al., 2005). The use of unscreened and well-screened (our study) controls may cause bias (Moskvina et al., 2005; Hill and Neiswanger, 1997). In this regard, we removed other psychiatric and medical disorders to an equal degree in controls and cases (Hill and Neiswanger, 1997). Moreover, since screening controls is indicated when examining a disease with higher prevalence rates (Moskvina et al., 2005), we excluded a phenotype (smoking) with a prevalence as high as 32% (in Paraná, Brazil; Nunes et al., 1999) from our controls. Doing so, we recruited a well-screened super-control group, which is not a random sample chosen from the population and therefore cannot be regarded as a population-control group. This may also explain why there is a significant departure from HWE for the STin2 VNTR polymorphism in our controls.

All in all, in this study we show a possible genetic link between the STin2 genetic polymorphism and the comorbidity between mood and TUD. Future studies in mood and TUD should always consider this dual diagnosis. Future research involving other genetic variants may further elucidate the interaction between genetics, depression, bipolar disorder and TUD.

Funding

This study was supported by Health Sciences Postgraduate Program at Londrina State University, Paraná, Brazil (UEL) and Fundação Araucária. MB is supported by a NHMRC Senior Principal Research Fellowship 1059660. MM is supported by a CNPq (Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia) PVE fellowship at the Health Sciences Graduate Program, Londrina State University (UEL).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors contributions

All authors participated in its design, reviewed drafts of the manuscript and approved the final version before submitting for publication.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Centre of Approach and Treatment for Smokers, Molecular Genetics Laboratory, and Clinical Immunology section of Clinical Analysis Laboratory of University Hospital of Londrina State University, Paraná, Brazil (UEL).

References

Ali, F.R., Vasiliou, S.A., Haddley, K., Paredes, U.M., Roberts, J.C., Miyajima, F., Klenova, E., Bubb, V.J., Quinn, J.P., 2010. Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF. *JNC*. 112(1), 296-306.

Alves de Lima, K., Guembarovski, R., Oda, J., Ramos, G., Oliveira, B., Cavalli, I., Ribeiro, E., Gonçalves, M., Aoki, M., Nunes, S.O.V., Watanabe, M.A.E., 2012. Association between the STin2 VNTR polymorphism and smoking behavior in oral cancer patients and healthy individuals. *Clin. Exp. Med.* 12, 13-19.

Anthenelli, R.C., 2014. Nicotine-related disorders. In: Gabbard, G.O. (Org.). *Gabbard's treatments of psychiatric disorders: DSM-5 Edition*. 5. ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, p. 871-883.

Audrain-McGovern, J., Rodriguez, D., Kassel, J.D., 2009. Adolescent smoking and depression: evidence for self-medication and peer smoking mediation. *Addiction* 104(10), 1743-1756.

Bah, J., Lindström, M., Westberg, L., Mannerås, L., Ryding, E., Henningsson, S., Melke, J., Rosén, I., Träskman-Bendz, L., Erikson, E. (2008). Serotonin transporter gene polymorphisms: effects on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters. *Psychiatr. Res. Neuroim.* 162, 221-229.

Berk, M., Williams, L.J., Jacka, F.N., O'Neil, A., Pasco, J.A., Moylan, S., Allen, N.B., Stuart, A.L., Hayley, A.C., Byrne, M.L., Maes, M., 2013. So depression is an inflammatory disease, but where the inflammation come from? *BMC Med.* 11, 200.

Berlin, I., Covey, L., Glassman, A., 2009. Smoking and depression: a co-morbidity. *J. Dual Diagnosis* 5(2), 149-158.

Bortolasci, C.C., Vargas, H.O., Souza-Nogueira, A., Barbosa, D.S., Moreira, E.G., Nunes, S.O., Berk, M., Dodd, S., Maes, M., 2014. Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene polymorphism-smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 159, 23-30.

Boden, J.M., Fergusson, D.M., Horwood, J., 2010. Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *Br. J. Psychiatry* 196, 440-446.

Breslau, N., Schultz, L., Johnson, E., Peterson, E., Davis, G., 2005. Smoking and the risk of suicidal behavior: a prospective study of a community sample. *Arch Gen Psychiatry* 62, 328-334.

Brody, L.C., Hamer, H.D., Haaga, D.A.F., 2005. Depression vulnerability, cigarette smoking, and the serotonin transporter gene. *Addict. Behav.* 30, 557-566.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386-389.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009. Cigarette smoking in the United States: current cigarette smoking among U.S. adults aged 18 years and older. <http://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/resources/data/cigarette-smoking-in-united-states.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010. Health behaviors of adults: United States, 2005-2007. *Vital and Health Statistics, Series 10, Number 245, Appendix II, p. 80.*

Collier, D.A., Stöber, G., Li, T., Heils, A., Catalano, M., Di Bella, D., Arranz, M.J., Murray, R.M., Vallada, H.P., Bengel, D., Müller, C.R., Roberts, G.W., Smeraldi, E., Kirov, G., Sham, P., Lesch, K.P., 1996. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol. Psychiatry* 1, 453-460.

David, S.P., Munafò, M.R., Murphy, M.F.G., Walton, R.T., Johnstone, E.C., 2007. The serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism and treatment response to nicotine patch: Follow-up of a randomized controlled trial. *Nicotine Tob. Res.* 9 (2), 225-231.

Del Ben, C.M., Vilela, J.A.A., Crippa, J.A.S., Hallak, J.E.C., Labate, C.M., Suadi, A.W., 2001. Confiabilidade da “entrevista clínica estruturada para o DSM-IV” – versão clínica traduzida para o português. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 23(3), 156-159.

Eddahibi, S., Chaouat, A., Morrell, N., Fadel, E., Fuhrman, C., Bugnet, A-S., Dartevelle, P., Housset, B., Hamon, M., Weitzenblum, E., Adnot, S., 2003. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 108, 1839-1844.

Farjadian, S., Moghtaderi, M., Fakhraei, B., Nasiri, M., Farjam, M., 2013. Association between serotonin transporter gene polymorphisms and childhood asthma. *J. Asthma* 50(10), 1031-1035.

Flensburg-Madsen, T., von Scholten, M.B., Flachs, E.M., Mortensen, E.L., Prescott, E. & Tolstrup, J.S., 2011. Tobacco smoking as a risk factor for depression. A 26-year population-based follow-up study. *J. Psychiatr. Res.* 45 (2), 143-149.

Furlong, R.A., Ho, L., Walsh, C., Rubinsztein, J.S., Jain, S., Paykel, E.S., Easton, D.F., Rubinsztein, D.C., 1998. Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. *Am. J. Med. Genet.* 81(1), 58-63.

Glassman, A.H., Covey, L.S., Stetner, F., Rivelli, S., 2001. Smoking cessation and the course of major depression: a follow-up study. *The Lancet* 357, 1929–1932.

Goodwin, R.D., Lavoie, K.L., Lemeshow, A.R., Jenkins, E., Brown, S., Fedoronko, D.A., 2012. Depression, anxiety, and COPD: the unexamined role of nicotine dependence. *Nicotine Tob. Res.* 14,176–183.

Goodwin, R.D., Prescott, M.R., Tamburrino, M., Calabrese, J.R., Liberzon, I., Galea, S., 2013. Cigarette smoking and subsequent risk of suicidal ideation among National Guard Soldiers. *J. Affect. Disord.* 145, 111-114.

Gutiérrez, B., Pintor, L., Gastó, C., Rosa, A., Bertranpetit, J., Vieta, E., Fañanás, L., 1998. Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. *Hum. Genet.* 103(3), 319-322.

Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 23,56–62.

Han, D-H., Joe, K-H., Na, C., Lee, Y-S., 2008. Effect of genetic polymorphisms on smoking cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers. *Psychiatr. Genet.* 18, 11-16.

Heffner, J.L., Strawn, J.R., DelBello, M.P., Strakowski, S.M., Anthenelli, R.M., 2011. The Co-occurrence of cigarette smoking and bipolar disorder: phenomenology and treatment considerations. *Bipolar Disord.* 13, 439-453.

Hernandez-Lopez, S., Garduño, J., Mihailescu, S., 2013. Nicotinic modulation of serotonergic activity in the dorsal raphe nucleus. *Rev. Neurosci.* 24(5), 455-469.

Hill, S.Y., Neiswanger, K., The value of narrow psychiatric phenotypes and super normal controls. Chapter 3 in: *Handbook of psychiatric Genetics*: Blum, K. and Noble, B.E., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1997, pp.37-49.

Ho, P-S., Ho, K.K-J., Huang, W-S., Yen, C-H., Shih, M-C., Shen, L-H., Ma, K-H., Huang, S-Y., 2013. Association study of serotonin transporter availability and SLC6A4 gene polymorphisms in patients with major depression. *Psychiatr. Res. Neuroimaging* 212, 216-222.

Hoehe, M.R., Wendel, B., Grunewald, I., Chiaroni, P., Levy, N., Morris-Rosendahl, D., Macher, J.P., Sander, T., Crocq, M.A., 1998. Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms are not associated with susceptibility to mood disorders. *Am. J. Med. Genet.* 81(1), 1-3.

Hu, S., Brody, C.L., Fisher, C., Gunzerath, L., Nelson, M.L., Sabol, S.Z., Sirota, L.A., Marcus, S.E., Greenberg, B.D., Murphy, D.L., Hamer, D.H., 2000. Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Mol. Psychiatry* 5(2), 181-188.

Hughes, J. R., 2008. Smoking and suicide: a brief overview. *Drug Alcohol Depend.* 98, 169–178.

Hughes, J.R., Stead, L.F., Hartmann-Boyce, J., Cahill, K., Lancaster, T., 2014. Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jan 8;1:CD000031. doi: 10.1002/14651858.CD000031.pub4. PubMed PMID: 24402784.

Ishii, T., Wakabayashi, R., Kurosaki, H., Gemma, A., Kida, K., 2011. Association of serotonin transporter gene variation with smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and its depressive symptoms. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 41-46.

Ishikawa, H., Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Yamakawa-Kobayashi, K., Endo, K., Lin, Y-L., Yanagi, H., Tsuchiya, S., Kawata, K-i., Hamaguchi, H., Arinami, T., 1999. Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking Japanese males. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8, 831-833.

Jamal, M., Van der, W., Does, A.J., Cuijpers, P., Penninx, B.W.J.H., 2012. Association of smoking and nicotine dependence with severity and course of symptoms in patients with depressive or anxiety disorder. *Drug Alcohol Depend.* 126(1-2), 138-146.

Johnson, E.O., Rhee, S.H., Chase, G.A., Breslau, N., 2004. Comorbidity of depression with levels of smoking: an exploration of the shared familial risk hypothesis. *Nicotine Tob. Res.* 6(6), 1029-1038.

Kaufman, J., Yang, B., Douglas-Palumber, H., Houshyar, S., Lipschitz, D., Krystal, J., Gelernter, J., 2004. Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children. *PNAS* 101 (49), 17316–17321.

Kendler, K.S., Neale, M.C., Maclean, C.J., Heath, A.C., Eaves, L.J., Kessler, C., 1993. Smoking and major depression: a causal analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* 50(1), 36-43.

Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., 2003. The Epidemiology of Major Depressive Disorder: Results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289 (23), 3095-3105.

- Khadrawy, Y.A., El-Shamy, K.A., Mohamed, S.I., 2011. Nicotine restores monoamine neurotransmitter changes in the cortex and hippocampus of reserpinized rats as a model of depression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15(8), 863-870.
- Klungsoyr, O., Nygar, J.F., Sorensen, T., Sandanger, I., 2006. Cigarette smoking and incidence of first depressive episode: an 11-Year, population-based follow-up Study. *Am. J. Epidemiol.* 163(5), 421-432.
- Kremmer, I., Bachner-Melman, R., Reshef, A., Broude, L., Nemanov, L., Gritsenko, I., Heresco-Levy, U., Elizur, Y., Ebstein, R.P., 2005. Association of the serotonin transporter gene with smoking behavior. *Am. J. Psychiatry* 162(5), 924-930.
- Kunugi, H., Hattori, M., Kato, T., Tatsumi, M., Sakai, T., Sasaki, T., Hirose, T., Nanko, S., 1997. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder. *Mol. Psychiatry* 2(6), 457-462.
- Lasser, K., Boyd, J.W., Woolhandler, S., Himmelstein, D.U., McCormick, D., Bor, D.H., 2000. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA* 284(20), 2606-2610.
- Leonard, B., Maes, M., 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 36, 764-785.
- Lerman, C., Shields, P., Audrain, J., Main, D., Cobb, B., Boyd, N., Caparaso, N., 1998. The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 253-255.
- Lerman, C., Caparaso, N., Audrain, J., Main, D., Boyd, N., Shields, P., 2000. Interacting effects of the serotonin transporter gene and neuroticism in smoking practices and nicotine dependence. *Mol. Psychiatry* 5, 189-192.
- Lesch, K.P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B.L., Murphy, D.L., Riederer, P., 1994. Organization of the human serotonin transporter gene. *J. Neural. Transm.* 95, 157-162.
- Lyons, M., Hitsman, B., Xian, H., Panizzon, M.S., Jerskey, B.A., Santangelo, S., Grant, M.D., Rende, R., Eisen, S., Eaves, L., Tsuang, M.T., 2008. A twin study of smoking, nicotine dependence, and major depression in men. *Nicotine Tob. Res.* 10(1), 97-108.
- Maes, M., Meltzer, H.Y., 1995. The serotonin hypothesis of major depression. *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, Raven Press, New York 10, 933-934.
- Maes, M., Meltzer, H.Y., Scharpé, S., Bosmans, E., Suy, E., De Meester, I., Calabrese, J., Cosyns, P., 1993. Relationships between lower plasma L-tryptophan levels and immune-inflammatory variables in depression. *Psychiatr. Res.* 49(2), 151-165.
- Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S., Berk, M., 2011. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the neurodegenerative process in the illness. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35(3), 676-692.

- Malone, K.M., Waternaux, C., Haas, G. L., Cooper, T.B., Li, S., Mann, J.J., 2003. Cigarette smoking, suicidal behavior, and serotonin function in major psychiatric disorders. *Am. J. Psychiatry* 160, 773-779.
- McCaffery, J.M., Stanton, C., Papandonatos, G.D., Lloyd-Richardson, E.E., Niaura, R., 2008. Depressive symptoms and cigarette smoking in twins from the national longitudinal study of adolescent health. *Am. Psychol. Assoc. Suppl.* 27 (3), 207-215.
- McEachin, R.C., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Kleyman-Smith, Y.D., Kar, T., Kare, R.K., Ade, A.S., Sartor, M.A., Cavalcoli, J.D., McInnis, M.G., 2010. Modeling complex genetic and environmental influences on comorbid bipolar disorder with tobacco use disorder. *BMC Med Genet.* 11:14.
- McGee, R., Williams, S., Nada-Raja, S., 2005. Is cigarette smoking associated with suicidal ideation among young people? *Am. J. Psychiatry* 162, 619–620.
- Moreno, R.A., Moreno, D.H., 1998. Hamilton and Montgomery & Åsberg depression rating scales. *Rev. Psiquiatr Clin.* 25, 262-272.
- Moskvina, V., Holmans, P., Schmidt, K.M., Craddock, N., 2005. Design of case-controls studies with unscreened controls. *Ann. Hum. Genet.* 69(Pt 5), 566-576.
- Munafò, M.R., Johnstone, E.C., Mackintosh, B., 2005. Association of serotonin transporter genotype with selective processing of smoking-related stimuli in current smokers and ex-smokers. *Nicotine Tob. Res.* 7 (5), 773-778.
- Munafò, M.R., Johnstone, E.C., Wileyto, E.P., Shields, P.G., Elliot, K.M., Lerman, C., 2006. Lack of association of 5-HTTLPR genotype with smoking cessation in a nicotine replacement therapy randomized trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15 (2), 398-400.
- Murphy, J., Horton, N., Monson, R., Laird, N., Sobol, A., Leighton, A., 2003. Cigarette smoking in relation to depression: historical trends from the Stirling County study. *Am. J. Psychiatry* 160 (9), 1663–1669.
- Nunes, S.O.V., Onishi, L.O., Hashimoto, S.M., Kikuchi, R., Toledo, L.G., Koike, A., Carmo, D., Paoliello, M., Matsuo, T., 1999. Family history and prevalence and tobacco dependence in a metropolitan area of southern Brazil. *Rev. Psiq. Clin.* 26(3),84-89.
- Nunes, S.O.V., Vargas, H.O., Prado, E., Barbosa, D.S., Melo, L.P., Moylan, S., Dodd, S., Berk, M., 2013. The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1336-1345.
- Olgivie, A.D., Battersby, S., Bubb, V.J., Fink, G., Harmar, A.J., Goodwin, G.M., Smith, C.A.D., 1996. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *The Lancet* 347, 731-733.
- O'Loughlin, J., DiFranza, J., Tyndale, R.F., Meshfedjian, G., McMillan-Davey, E., Clarke, P.B., Hanley, J., Paradis, G., 2003. Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents. *Am. J. Prev. Med.* 25(3), 219-225.

Pasco, J.A., Williams, L.J., Jacka, F. N., Ng, F., Henry, M, J., Nicholson, G.C., Kotowicz, M.A., Berk, M., 2008. Tobacco smoking as a risk factor for major depressive disorder: population-based study. *Br. J. Psychiatry* 193, 322-326.

Patton, G.C., Carlin, J.B., Coffey, C., Wolfe, R., Hibbert, M., Bowes, G., 1998. Depression, anxiety, and smoking initiation: a prospective study over 3 years. *Am. J. Public Health* 88 (10), 1518-1522.

Pedersen, W., von Soest, T., 2009. Smoking, nicotine dependence and mental health among young adults: a 13-year population-based longitudinal study. *Addiction* 104(1), 129-137.

Rees, M., Norton, N., Jones, I., McCandless, F., Scourfield, J., Holmans, P., Moorhead, S., Feldman, E., Sadler, S., Cole, T., Redman, K., Farmer, A., McGuffin, P., Owen, M.J., Craddock, N., 1997. Association studies of bipolar disorder at the human serotonin transporter gene (hSERT; 5HTT). *Mol. Psychiatry* 2(5), 398-402.

Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K-Y., Eaves, L., Hoh, J., Griem, A., Kovacs, M., Ott, J., Merikangas, K. R., 2009. Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression: A Meta-analysis. *JAMA*. 17 301(23), 2462–2471.

Sarosi, A., Gonda, X., Balogh, G., Domotor, E., Szekely, A., Hejjas, K., Sasvari-Szekely, M., Faludi, G., 2008. Association of the STin2 polymorphism of the serotonin transporter gene with a neurocognitive endophenotype in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1667-1672.

Serretti, A., Calati, R., Mandelli, L., De Ronchi, D., 2006. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr. Drug Targets* 7, 1659-1669.

Sieminska, A., Buczkowski, K., Jassen, E., Tkacz, E., 2008. Lack of association between serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR and smoking among Polish population: a case-control study. *BMC Med. Genet.* 9, 76.

Skowronek, M.H., Laucht, M., Hohm, E., Becker, K., Schmidt, M., 2006. Interaction between the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter promoter polymorphisms in alcohol and tobacco use among 15-year-olds. *Neurogenetics* 7, 239-246.

Trummer, O., Köppel, H., Wascher, T.C., Grünbacher, G., Gutjahr, M., Stanger, O., Ramschak-Schwarzer, S., Boehm, B.O., Winkelmann, B.R., März, W., Renner, W., 2006. The serotonin transporter gene polymorphism is not associated with smoking behavior. *Pharmacogenomics J.* 6, 397-400.

Tsuang, M.T., Francis, T., Minor, K., Thomas, A., Stone, W.S., 2012. Genetics of smoking and depression. *Hum. Genet.* 131 (6), 905-915.

Watanabe, M.A.E., Nunes, S.O.V., Amarante, M.K., Guembarovski, R.L., Oda, J.M.M., Lima, K.W.A.D., Fungaro, M.H.P., 2011. Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR: involvement in smoking behaviour. *J. Genet.* 90, 179-185.

World Health Organization (WHO), 2002. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addiction* 97(9), 1183-1194.

Yang, Z., Seneviratne, C., Wang, S., Ma, J.Z., Payene, T.J., Wang, J., Li, M.D., 2013. Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European, American and African smokers. *Drug Alcohol Depend.* 129, 217-225.

Ziedonis, D., Hitsman, B., Beckham, J.C., Zvolensky, M., Adler, L.E., Audrain-McGovern, J., Breslau, N., Brown, R.A., George, T.P., Williams, J., Calhoun, P.S., Riley, W.T., 2008. Tobacco use and cessation in psychiatric disorders: National Institute of Mental Health report. *Nicotine Tob. Res.* 10(12), 1691-1715.

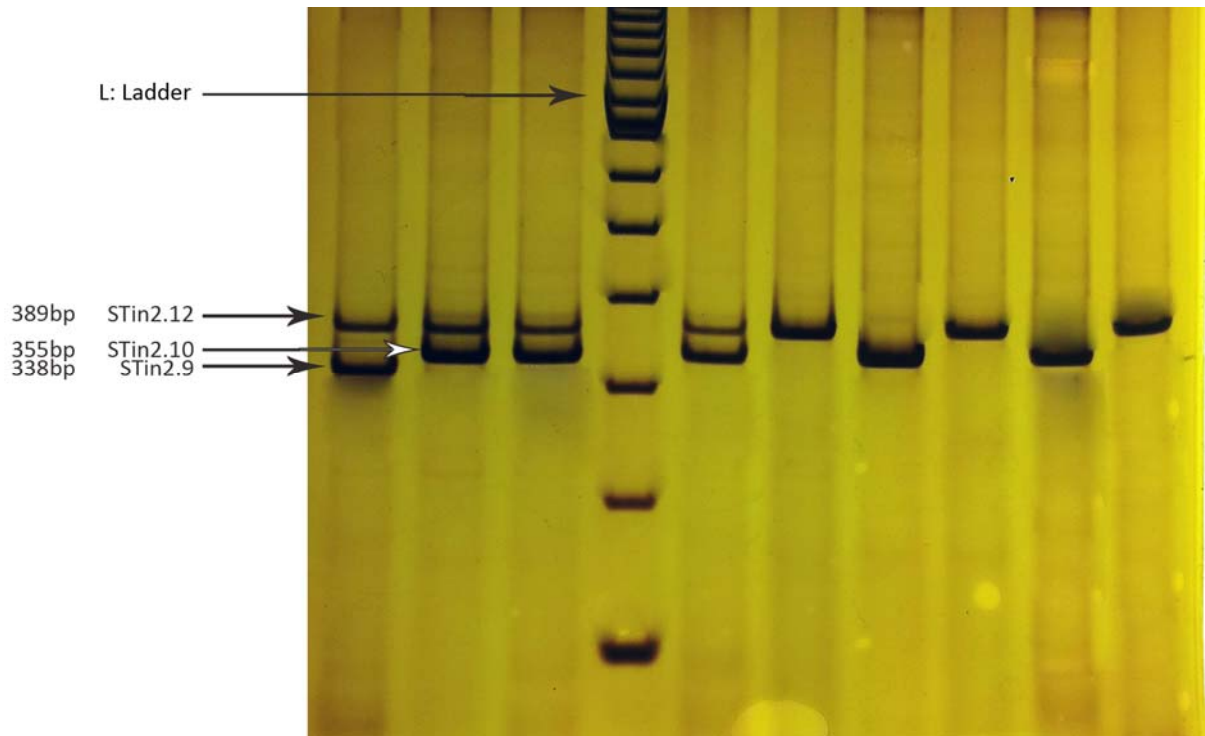


Figure 1. Electroforetic profile of STin2 VNTR. Polyacrylamide gel 10% stained with silver nitrate. The arrows indicate specific sizes of alleles 9, 10 and 12. L: Ladder DNA fragment marker of 100bp.

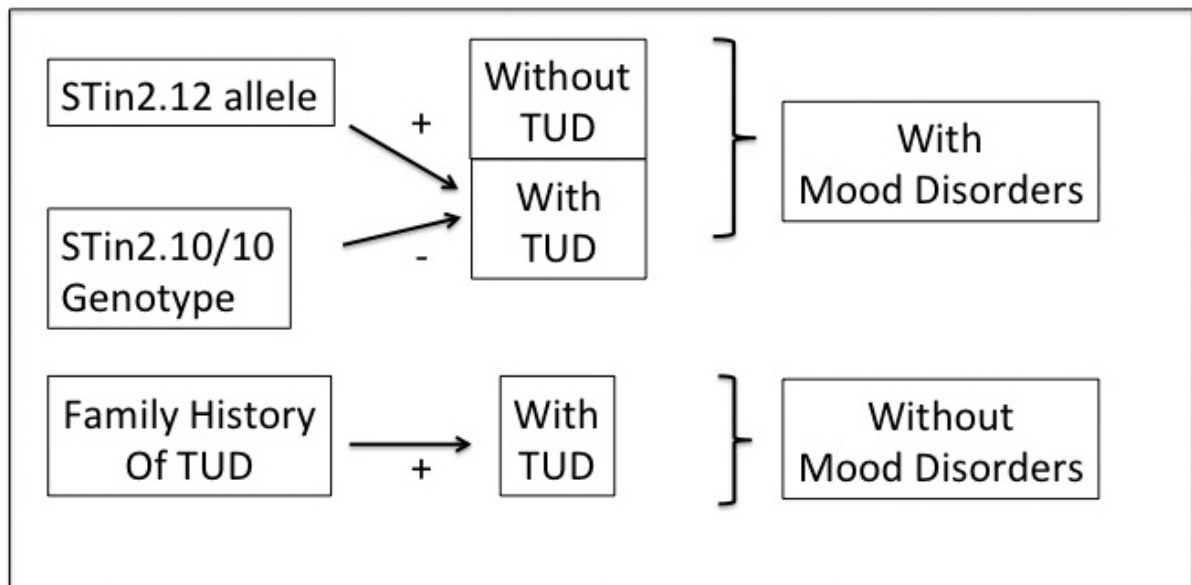


Figure 2. Model of the associations between the STin2.10/10 genotype and STin2.12 allele and tobacco use disorder in subjects with mood disorders.

Table 1. Socio-demographic and clinical characteristics of patients with tobacco use disorder (TUD) and mood disorders (MOOD)

Characteristics	1. No TUD and No Mood (n=113)	2. No TUD and Mood(n=62)	3. TUD and No Mood(n=90)	4. TUD and Mood(n=95)	For χ^2 or Ψ	df	p-value
Age (Years)	45.2 (\pm 8.1)	46.5 (\pm 6.9)	49.8 (\pm 9.6)	47.7 (\pm 11.2)	4.32	3 / 356	0.005
Gender							
Male	44 (39%)	11 (18%)	43 (48%)	23 (24%)	20.29	3	<0.001
Female	69 (61%)	51 (82%)	47 (52%)	72 (76%)			
Ethnicity							
Caucasian	76 (68%)	43 (70%)	63 (70%)	66 (70%)	2.53*	6	0.866
African	12 (11%)	5 (8%)	10 (11%)	9 (9%)			
Asian	9 (7%)	3 (4%)	4 (5%)	10 (1%)			
Mixed	16 (14%)	11 (18%)	13 (14%)	19 (20%)			
Marital status							
Single	16 (14%)	10 (16%)	8 (9%)	19 (20%)	6.53**	3	0.088
Stable relationship	79 (70%)	42 (68%)	61 (68%)	52 (55%)			
Divorced/separated	18 (16%)	10 (16%)	15 (17%)	20 (21%)			
Widowed	0	0	6 (6%)	4 (4%)			
Years of education	15.4 (\pm 4.0)	17.0 (\pm 6.1)	9.9 (\pm 5.0)	9.3 (\pm 5.6)	47.00	3/356	<0.001
Employment status							
Employed or student	113 (100%)	62 (100%)	78 (87%)	77 (81%)	-0.29&	-	<0.001
Unemployed	0	0	8 (9%)	12 (13%)			
Disability support payments	0	0	4 (4%)	6 (6%)			
BMI (kg / m²)	26.4 (\pm 4.1)	26.7 (\pm 4.5)	26.2 (\pm 5.7)	26.9 (\pm 6.1)	0.34	3/356	0.795
Hamilton scale	1.6 (\pm 2.1)	7.3 (\pm 8.1)	4.8 (\pm 4.6)	15.5 (\pm 10.1)	78.58	3 / 356	<0.001
TUD family history							
Yes	78 (69%)	50 (80%)	78 (87%)	86 (91%)	18.07	3	<0.001
No	35 (31%)	12 (20%)	12 (13%)	9 (9%)			
Family psychiatric history							
Yes	36 (31%)	27 (43%)	22 (24%)	37 (39%)	7.46	3	0.059
No	77 (69%)	35 (57%)	68 (76%)	58 (61%)			

Continuous variables are shown as mean (\pm SD) and categorical variables are expressed as n and percentage %

All results of analyses of contingency tables (χ^2 chi-square test), analyses of variance (F values) or Fisher's exact probability test (with ψ coefficient of association)

BMI: body mass index

* Caucasians versus African + Asian versus Mixed;

** Stable relationship versus single + divorced + separated + widowed;

& No TUD versus TUD (Fisher exact probability test)

Table 2. Association of the STin2 VNTR polymorphism with tobacco use disorder (TUD) and mood disorders (MOOD)

SLC6A4 (STin2 VNTR)		1. No TUD No Mood n=113	2. No TUD and Mood n= 62	3. TUD and No Mood n=90	4. TUD and Mood n=95	χ^2	df	p-value
Allelic Variants	STin2.12	83 (73%)	12 (19%)	74 (82%)	85 (89%)	14.17	3	0.003*
	STin2.10	60 (53%)	39 (62%)	46 (51%)	51 (53%)	2.32	3	0.508
	STin2.9	2 (1%)	0	3 (3%)	3 (3%)	0.89	3	0.827
Genotypes	STin2.12/12	50 (44%)	22 (35%)	41 (45%)	41 (43%)	1.76	3	0.624
	STin2.12/10	31 (27%)	19 (30%)	30 (33%)	41 (43%)	5.99	3	0.112
	STin2.12/9	2 (1%)	1 (1%)	3 (3%)	3 (3%)	0.89	3	0.827
	STin2.10/10	29 (25%)	20 (32%)	16 (17%)	10 (10%)	13.59	3	0.004*
	STin2.10/9	0	0	0	0			
	STin2.9/9	1	0	0	0			

χ^2 indicates results of analysis of contingency tables; Allelic variants and genotypes are expressed as n and % of the different allelic variants or genotypes.

Table 3. Results of multinomial logistic regression analyses with diagnostic groups as dependent variable and STin2 alleles and genotypes as predictor Variables.

Alleles / genes	X ²	df	p-value	Parameter estimates Wald values for contrasts	p-value	OR	95%CI
STin2.12	14.17	3	0.003	1 vs 2: 0.64	0.425	0.76	0.39 – 1.49
				1 vs 3: 2.18	0.140	1.67	0.84 – 3.31
				1 vs 4: 8.02	0.005	3.07	1.41 – 6.68
STin2.10	2.32	3	0.508	1 vs 2: 1.56	0.212	0.67	0.35 – 1.26
				1 vs 3: 0.08	0.778	1.08	0.62 – 1.88
				1 vs 4: 0.00	0.933	0.98	0.57 – 1.69
STin2.12/12	1.76	3	0.624	1 vs 2: 1.27	0.261	1.44	0.76 – 2.73
				1 vs 3: 0.04	0.852	0.95	0.54 – 1.66
				1 vs 4: 0.03	0.875	1.05	0.60 – 1.81
STin2.12/10	5.99	3	0.112	1 vs 2: 2.02	0.653	0.86	0.43 – 1.69
				1 vs 3: 0.83	0.363	0.76	0.41 – 1.38
				1 vs 4: 5.57	0.018	0.49	0.50 – 0.89
STin2.10/10	13.60	3	0.004	1 vs 2: 0.86	0.354	1.38	0.70 – 2.72
				1 vs 3: 1.79	0.181	0.63	0.32 – 1.24
				1 vs 4: 7.33	0.007	0.34	0.16 – 0.74

1: No tobacco use disorder and no mood disorders; 2: Mood disorders but no tobacco use disorder; 3: Tobacco use disorder but no mood disorders; 4: Tobacco use disorder and mood disorders. OR: Odds ratio with 95% Confidence intervals (CI); χ^2 : chi-square test.

Table 4. Results of automatic multinomial logistic regression analyses with four diagnostic groups as dependent variable and STin2.12 allele frequency (logistic regression 1) or STin2.10/10 genotype distribution (logistic regression 2) and socio-demographic and clinical data as predictor variables

Variables	χ^2	df	p-value	Wald for contrasts	p-value	OR	95%CI
1. Three predictors:	161.85	9	<0.001				
ST2in2.12	12.59	3	0.006				
Gender	20.18	3	<0.001				
Education	127.26	3	<0.001				
				Contrasts:			
				1 vs 2: 7.89 (gender)	0.005	0.34	0.16 – 0.72
				1 vs 3: 46.50 (education)	<0.001	0.78	0.73 – 0.84
				1 vs 4: 7.32 (STin2.10/10)	<0.001	0.29	0.12 – 0.71
				1 vs 4: 4.09 (gender)	0.043	0.50	0.25 – 0.98
				1 vs 4: 54.38 (education)	<0.001	0.76	0.71 – 0.82
2. Three predictors:	161.85	9	<0.001				
ST2in2.10/10	13.03	3	0.005				
Gender	127.18	3	<0.001				
Education	20.11	3	<0.001				
				Contrasts:			
				1 vs 2: 7.80 (gender)	0.005	0.34	0.16 – 0.72
				1 vs 3: 46.50 (education)	<0.001	0.78	0.73 – 0.84
				1 vs 4: 8.01 (ST2in2.12)	<0.001	3.60	1.48 – 8.72
				1 vs 4: 4.15 (gender)	0.042	0.49	0,25 – 0.97
				1 vs 4: 54.34 (education)	<0.001	0.76	0.71 – 0.82

This Table shows the results of two different multinomial logistic regression analyses, i.e. 1 and 2

*Only the significant explanatory variables which separate the three patient groups (groups 2, 3 and 4) from the controls (group 1) are shown

1: No tobacco use disorder and no mood disorders; 2: Mood disorders but no tobacco use disorder; 3: Tobacco use disorder but no mood disorders; 4: Tobacco use disorder and mood disorders.

OR: Odds ratio with 95% Confidence intervals (CI)

χ^2 : chi-square test

Table 5. Associations between the STin2 VNTR polymorphism or a family history of tobacco use disorder (TUD) in individuals stratified according to TUD and mood disorders (MOOD).

Variables		No MOOD		MOOD		χ^2	df	p-value
		No TUD	TUD	No TUD	TUD			
		n=113	n=90	n=62	n=95			
STin2.12 Allele	No	30	16	20	10	2.20*	1	0.138
	Yes	83	74	42	85	11.46**	1	0.001
STin2.10/10 genotype	No	84	74	42	85	1.81*	1	0.179
	Yes	29	16	20	10	11.46**	1	0.001
TUD family history	No	35	12	12	9	8.76*	1	0.003
	Yes	78	78	50	86	3.32**	1	0.069

χ^2 : chi-square test

* χ^2 test performed in individuals without mood disorders (No MOOD)

** χ^2 test performed in individuals with mood disorders (MOOD)

6 CONCLUSÕES

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

(Dalai Lama)

Pacientes com TUT que buscaram a cessação do tabagismo foram, predominantemente, do sexo feminino, com a idade média de 48,7 anos. Os pacientes com TUT não tiveram diferenças significativas em relação ao gênero, etnia e IMC, no entanto, apresentaram níveis de educação mais baixos, mais desemprego e auxílio-doença, relacionamentos menos estáveis, mais transtornos do humor e maior risco do uso de álcool e sedativos, comparados com os controles nunca fumantes. É muito difícil a obtenção de uma amostra homogênea em um país tão cultural e etnicamente diverso como o Brasil, mas os indivíduos analisados neste estudo foram, em sua maioria, de etnia caucasóide e geograficamente da mesma região (Norte do Paraná).

Nos quatro grupos estudados: 1) nunca fumantes sem transtornos do humor, 2) nunca fumantes com transtornos do humor, 3) pacientes com TUT sem transtornos do humor, 4) pacientes com TUT com transtornos do humor, não houve diferenças significativas relacionadas à idade, etnia, situação conjugal, IMC e história familiar de transtornos mentais. O grupo 4 teve predominância de indivíduos do sexo feminino, apresentou níveis de educação mais baixos, mais desemprego e auxílio-doença, maior gravidade da depressão, teve mais história familiar de TUT, quando comparado ao grupo 1.

Nossos resultados indicam que pacientes com TUT que buscaram tratamento em Centro de Referência apresentam altas taxas de comorbidade com transtornos do humor. Nossos dados também indicam que o genótipo STin2.10/10 está positivamente associado à proteção ao TUT e a fumar menos anos e menos maço, enquanto o alelo STin2.12 está positivamente associado ao TUT, mas não à resposta ao tratamento ou à gravidade da dependência de nicotina ou à idade de início de uso do tabaco. O alelo STin2.12 está positivamente associado e o genótipo STin2.10/10 está negativamente associado ao TUT comórbido com transtornos do humor, sugerindo que este polimorfismo pode estar associado a ambos os transtornos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*“Buscar o conhecimento, valorizar o saber e
construir ideias é viver em plenitude...
É colher a essência e o néctar das flores,
para encantar e contagiar no jardim da vida.”*

(Deolinda Cornicelli Buosi)

Assim, a presença do alelo 12 pode aumentar a suscetibilidade ao TUT. Por outro lado, pode-se supor que os indivíduos com o genótipo 10/10 podem apresentar menor risco de dependência de nicotina, ou até mesmo ter maior sucesso na cessação do tabagismo, devido a uma menor eficiência de recaptação de serotonina.

Os indivíduos com baixa concentração de serotonina no SNC, provavelmente, devido à presença do alelo com a expressão elevada de 5-HTT, como STin2. 12, pode estar ligada aos baixos níveis de serotonina em fenda sináptica, contribuindo portanto, no desenvolvimento da dependência de nicotina comórbida com transtornos do humor.

As implicações na prática clínica desses achados incluem a oportunidade de identificar subgrupos de indivíduos com TUT que pretendem parar de fumar, que apresentam comorbidade com transtornos do humor e associação do polimorfismo do gene transportador da serotonina. Esta linha de pesquisa poderá, no futuro, ajudar os clínicos a individualizarem o tratamento de cessação de tabaco.

Pesquisas futuras deverão estudar a associação do STin2 VNTR com comorbidade entre transtornos do humor e TUT ampliando para estresse precoce de vida, conduta suicida, transtornos de ansiedade e associações com alterações de biomarcadores de estresse oxidativo, síndrome metabólica e atividade inflamatória.

Espera-se que novos tratamentos adjuvantes, tal como o tratamento com a N-acetilcisteína (NAC), um suplemento nutracêutico, que aumenta os níveis intracelulares de glutathione, um importante antioxidante, possa ter eficácia no tratamento de TUT por reduzir a fissura, os comportamentos de recompensa, reduzir sintomas depressivos, aumentar as taxas de cessação do tabagismo, bem como reduzir a morbidade e mortalidade, nesta população de TUT comórbida com transtornos do humor.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package. Geneva: World Health Organization; 2008.
2. Nunes, S.O.V., Onishi, L.O., Hashimoto, S.M., Kikuchi, R., Toledo, L.G., Koike, A., Carmo, D., Paoliello, M., Matsuo, T. Family history and prevalence and tobacco dependence in a metropolitan area of southern Brazil. *Rev Psiq Clín.* 1999;26(3):84-89.
3. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking 2000. *Lancet.* 2003 Sep 13;362(9387):847-52.
4. McEachin RC, Saccone NL, Saccone SF, Kleyman-Smith YD, Kar T, Kare RK, Ade AS, Sartor MA, Cavalcoli JD, McInnis MG. Modeling complex genetic and environmental influences on comorbid bipolar disorder with tobacco use disorder. *BMC Med Genet.* 2010 Jan 26;11:14. doi:10.1186/1471-2350-11-14.
5. Castro MR, Matsuo T, Nunes SO. Clinical characteristics and quality of life of smokers at a referral center for smoking cessation. *J Bras Pneumol.* 2010 Jan-Feb;36(1):67-74.
6. Nunes SO, Vargas HO, Brum J, Prado E, Vargas MM, de Castro MR, Dodd S, Berk M. A comparison of inflammatory markers in depressed and non-depressed smokers. *Nicotine Tob Res.* 2012 May;14(5):540-6. doi:10.1093/ntr/ntr247.
7. Nunes SOV, De Castro MRP, Vargas HO, Vargas MM, Bueno RRM, Fonseca ICB, Dodd S, Berk M: Clinical characteristics and smoking cessation: an analysis of sex and depressive disorders differences. *Addict Disord Their Treat* 2013, 12(3):158-165.
8. Nunes SO, Vargas HO, Prado E, Barbosa DS, de Melo LP, Moylan S, Dodd S, Berk M. The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Sep;37(8):1336-45. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.014.

9. Vargas HO, Nunes SO, Pizzo de Castro M, Bortolasci CC, Sabbatini Barbosa D, Kaminami Morimoto H, Venugopal K, Dodd S, Maes M, Berk M. Oxidative stress and lowered total antioxidant status are associated with history of suicide attempts. *J Affect Disord*. 2013 Sep 25;150(3):923-30. doi:10.1016/j.jad.2013.05.016.
10. Vargas HO, Nunes SO, de Castro MR, Vargas MM, Barbosa DS, Bortolasci CC, Venugopal K, Dodd S, Berk M. Oxidative stress and inflammatory markers are associated with depression and nicotine dependence. *Neurosci Lett*. 2013 Jun 7;544:136-40. doi:10.1016/j.neulet.2013.03.059.
11. Odebrecht Vargas Nunes S, Pizzo de Castro MR, Ehara Watanabe MA, Losi Guembarovski R, Odebrecht Vargas H, Reiche EM, Kaminami Morimoto H, Dodd S, Berk M. Genetic polymorphisms in glutathione-S- transferases are associated with anxiety and mood disorders in nicotine dependence. *Psychiatr Genet*. 2014 Jun;24(3):87-93. doi:10.1097/YPG.0000000000000023.
12. Dome P, Lazary J, Kalapos MP, Rihmer Z. Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Mar;34(3):295-342. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.07.013.
13. Patton GC, Carlin JB, Coffey C, Wolfe R, Hibbert M, Bowes G. Depression, anxiety, and smoking initiation: a prospective study over 3 years. *Am J Public Health*. 1998 Oct;88(10):1518-22.
14. Lasser K, Boyd JW, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormick D, Bor DH. Smoking and mental illness: a population-based prevalence study. *JAMA*. 2000 Nov 22-29;284(20):2606-10.
15. Glassman AH, Covey LS, Stetner F, Rivelli S. Smoking cessation and the course of major depression: a follow-up study. *Lancet*. 2001 Jun 16;357(9272):1929-32.
16. Murphy JM, Horton NJ, Monson RR, Laird NM, Sobol AM, Leighton AH. Cigarette smoking in relation to depression: historical trends from the Stirling County study. *Am J Psychiatry*. 2003 Sep;160(9):1663-9.

17. Klungsøyr O, Nygård JF, Sørensen T, Sandanger I. Cigarette smoking and incidence of first depressive episode: an 11-year, population-based follow-up study. *Am J Epidemiol*. 2006 Mar 1;163(5):421-32.
18. Ziedonis D, Hitsman B, Beckham JC, Zvolensky M, Adler LE, Audrain-McGovern J, Breslau N, Brown RA, George TP, Williams J, Calhoun PS, Riley WT. Tobacco use and cessation in psychiatric disorders: National Institute of Mental Health report. *Nicotine Tob Res*. 2008 Dec;10(12):1691-715. doi:10.1080/14622200802443569.
19. Pasco JA, Williams LJ, Jacka FN, Ng F, Henry MJ, Nicholson GC, Kotowicz MA, Berk M. Tobacco smoking as a risk factor for major depressive disorder: population-based study. *Br J Psychiatry*. 2008 Oct;193(4):322-6. doi:10.1192/bjp.bp.107.046706.
20. Berlin I, Covey L, Glassman A. Smoking and depression: a co-morbidity. *J. Dual Diagnosis*. 2009;5(2):149-158.
21. Pedersen W, von Soest T. Smoking, nicotine dependence and mental health among young adults: a 13-year population-based longitudinal study. *Addiction*. 2009 Jan;104(1):129-37. doi:10.1111/j.1360-0443.2008.02395.x.
22. Boden JM, Fergusson DM, Horwood LJ. Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *Br J Psychiatry*. 2010 Jun;196(6):440-6. doi:10.1192/bjp.bp.109.065912.
23. Flensburg-Madsen T, von Scholten MB, Flachs EM, Mortensen EL, Prescott E, Tolstrup JS. Tobacco smoking as a risk factor for depression. A 26-year population-based follow-up study. *J Psychiatr Res*. 2011 Feb;45(2):143-9. doi:10.1016/j.jpsychires.2010.06.006.
24. Jamal M, Willem Van der Does AJ, Cuijpers P, Penninx BW. Association of smoking and nicotine dependence with severity and course of symptoms in patients with depressive or anxiety disorder. *Drug Alcohol Depend*. 2012 Nov 1;126(1-2):138-46. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.05.001.

25. Goodwin RD, Prescott MR, Tamburrino M, Calabrese JR, Liberzon I, Galea S. Cigarette smoking and subsequent risk of suicidal ideation among National Guard Soldiers. *J Affect Disord*. 2013 Feb 15;145(1):111-4. doi:10.1016/j.jad.2012.05.003.
26. Malone KM, Waternaux C, Haas GL, Cooper TB, Li S, Mann JJ. Cigarette smoking, suicidal behavior, and serotonin function in major psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*. 2003 Apr;160(4):773-9.
27. Breslau N, Schultz LR, Johnson EO, Peterson EL, Davis GC. Smoking and the risk of suicidal behavior: a prospective study of a community sample. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Mar;62(3):328-34.
28. McGee R, Williams S, Nada-Raja S. Is cigarette smoking associated with suicidal ideation among young people? *Am J Psychiatry*. 2005 Mar;162(3):619-20.
29. Hughes JR. Smoking and suicide: a brief overview. *Drug Alcohol Depend*. 2008 Dec 1;98(3):169-78. doi:10.1016/j.drugalcdep.2008.06.003.
30. Goodwin RD, Lavoie KL, Lemeshow AR, Jenkins E, Brown ES, Fedoronko DA. Depression, anxiety, and COPD: the unexamined role of nicotine dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012 Feb;14(2):176-83. doi:10.1093/ntr/ntr165.
31. Brody CL, Hamer DH, Haaga DA. Depression vulnerability, cigarette smoking, and the serotonin transporter gene. *Addict Behav*. 2005 Mar;30(3):557-66.
32. Tsuang MT, Francis T, Minor K, Thomas A, Stone WS. Genetics of smoking and depression. *Hum Genet*. 2012 Jun;131(6):905-15. doi:10.1007/s00439-012-1170-6.
33. Mrazek DA. *Psychiatric pharmacogenomics*. New York: Oxford University Press; 2010.
34. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003 Jul 18;301(5631):386-9.

35. Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Houshyar S, Lipschitz D, Krystal JH, Gelernter J. Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17316-21.
36. Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*. 2009 Jun 17;301(23):2462-71. doi:10.1001/jama.2009.878.
37. Lerman C, Shields PG, Audrain J, Main D, Cobb B, Boyd NR, Caporaso N. The role of the serotonin transporter gene in cigarette smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998 Mar;7(3):253-5.
38. Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin YL, Yanagi H, Tsuchiya S, Kawata K, Hamaguchi H, Arinami T. Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Sep;8(9):831-3.
39. 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. *Mol Psychiatry*. 2000 Mar;5(2):189-92.
40. Hu S, Brody CL, Fisher C, Gunzerath L, Nelson ML, Sabol SZ, Sirota LA, Marcus SE, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. Interaction between the serotonin transporter gene and neuroticism in cigarette smoking behavior. *Mol Psychiatry*. 2000 Mar;5(2):181-8.
41. Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, Dartevelle P, Housset B, Hamon M, Weitzenblum E, Adnot S. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation*. 2003 Oct 14;108(15):1839-44.
42. Kremer I, Bachner-Melman R, Reshef A, Broude L, Nemanov L, Gritsenko I, Heresco-Levy U, Elizur Y, Ebstein RP. Association of the serotonin transporter gene with smoking behavior. *Am J Psychiatry*. 2005 May;162(5):924-30.

43. Munafò MR, Johnstone EC, Mackintosh B. Association of serotonin transporter genotype with selective processing of smoking-related stimuli in current smokers and ex-smokers. *Nicotine Tob Res.* 2005 Oct;7(5):773-8.
44. Munafò MR, Johnstone EC, Wileyto EP, Shields PG, Elliot KM, Lerman C. Lack of association of 5-HTTLPR genotype with smoking cessation in a nicotine replacement therapy randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Feb;15(2):398-400.
45. Skowronek MH, Laucht M, Hohm E, Becker K, Schmidt MH. Interaction between the dopamine D4 receptor and the serotonin transporter promoter polymorphisms in alcohol and tobacco use among 15-year-olds. *Neurogenetics.* 2006 Nov;7(4):239-46.
46. Trummer O, Köppel H, Wascher TC, Grünbacher G, Gutjahr M, Stanger O, Ramschak-Schwarzer S, Boehm BO, Winkelmann BR, März W, Renner W. The serotonin transporter gene polymorphism is not associated with smoking behavior. *Pharmacogenomics J.* 2006 Nov-Dec;6(6):397-400.
47. David SP, Munafò MR, Murphy MF, Walton RT, Johnstone EC. The serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism and treatment response to nicotine patch: Follow-up of a randomized controlled trial. *Nicotine Tob Res.* 2007 Feb;9(2):225-31.
48. Han DH, Joe KH, Na C, Lee YS. Effect of genetic polymorphisms on smoking cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers. *Psychiatr Genet.* 2008 Feb;18(1):11-6. doi:10.1097/YPG.0b013e3282df0939.
49. Sieminska A, Buczkowski K, Jassem E, Tkacz E. Lack of association between serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR and smoking among Polish population: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2008 Aug 8;9:76. doi:10.1186/1471-2350-9-76.
50. Watanabe MA, Nunes SO, Amarante MK, Guembarovski RL, Oda JM, Lima KW, Fungaro MH. Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR: involvement in smoking behaviour. *J Genet.* 2011 Apr;90(1):179-85.

51. Ishii T, Wakabayashi R, Kurosaki H, Gemma A, Kida K. Association of serotonin transporter gene variation with smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and its depressive symptoms. *J Hum Genet.* 2011 Jan;56(1):41-6. doi:10.1038/jhg.2010.133.
52. de Lima KW, Guembarovski RL, Oda JM, Ramos G, Oliveira BV, Cavalli IJ, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Gonçalves MS, Aoki MN, Nunes SO, Watanabe MA. Association between the STin2 VNTR polymorphism and smoking behavior in oral cancer patients and healthy individuals. *Clin Exp Med.* 2012 Mar;12(1):13-9. doi:10.1007/s10238-011-0140-y.
53. Yang Z, Seneviratne C, Wang S, Ma JZ, Payne TJ, Wang J, Li MD. Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European American and African smokers. *Drug Alcohol Depend.* 2013 May 1;129(3):217-25. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.12.007.
54. Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem.* 1996 Jun;66(6):2621-4.
55. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect.* 1994;95(2):157-62.
56. Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM, Smith CA. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet.* 1996 Mar 16;347(9003):731-3.
57. Battersby S, Ogilvie AD, Blackwood DH, Shen S, Muqit MM, Muir WJ, Teague P, Goodwin GM, Harmar AJ. Presence of multiple polyadenylation signals and a single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the human serotonin transporter gene. *J Neurochem.* 1999 Apr;72(4):1384-8.
58. Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets.* 2006 Dec;7(12):1659-69.

59. Sarosi A, Gonda X, Balogh G, Domotor E, Szekely A, Hejjas K, Sasvari-Szekely M, Faludi G. Association of the STin2 polymorphism of the serotonin transporter gene with a neurocognitive endophenotype in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Oct 1;32(7):1667-72. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.06.014.
60. Ho PS, Ho KK, Huang WS, Yen CH, Shih MC, Shen LH, Ma KH, Huang SY. Association study of serotonin transporter availability and SLC6A4 gene polymorphisms in patients with major depression. *Psychiatry Res*. 2013 Jun 30;212(3):216-22. doi:10.1016/j.psychresns.2012.04.005.
61. Bah J, Lindström M, Westberg L, Mannerås L, Ryding E, Henningsson S, Melke J, Rosén I, Träskman-Bendz L, Eriksson E. Serotonin transporter gene polymorphisms: effects on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters. *Psychiatry Res*. 2008 Apr 15;162(3):221-9. doi:10.1016/j.psychresns.2007.07.004.
62. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007 May;131(5):1557-66.
63. Prochaska JJ. Smoking and Mental Illness- Breaking the Link. *N Engl J Med*. 2011 Jul 21;365(3):196-8. doi:10.1056/NEJMp1105248.
64. Callaghan RC, Veldhuizen S, Jeysingh T, Orlan C, Graham C, Kakouris G, Remington G, Gatley J. Patterns of tobacco-related mortality among individuals diagnosed with schizophrenia, bipolar disorder, or depression. *J Psychiatr Res*. 2014 Jan;48(1):102-10.
65. Arinami T, Ishiguro H, Onaivi ES. Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. *Eur J Pharmacol*. 2000 Dec 27;410(2-3):215-226.
66. Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest*. 2003 May;123(5):1730-9.

67. Chatkin JM. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. *J. Bras. Pneumol.* 2006 Nov-Dec;32(6):573-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000600016>
68. Ali FR, Vasiliou SA, Haddley K, Paredes UM, Roberts JC, Miyajima F, Klenova E, Bubb VJ, Quinn JP. Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF. *J Neurochem.* 2010 Jan;112(1):296-306. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06453.x.
69. Sullivan PF, Kendler KS. The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res.* 1999;1 Suppl 2:S51-7; discussion S69-70.
70. Nilsson KW, Orelund L, Kronstrand R, Leppert J. Smoking as a product of gene environment interaction. *Ups J Med Sci.* 2009;114(2):100-7. doi:10.1080/03009730902833406.
71. Li MD, Cheng R, Ma JZ, Swan GE. A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction.* 2003 Jan;98(1):23-31.
72. Lerman C, Berrettini W. Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003 Apr 1;118B(1):48-54.
73. Chu SL, Xiao D, Wang C, Jing H. Association between 5-hydroxyptamine transporter gene-linked polymorphic region and smoking behavior in Chinese males. *Chin Med J (Engl).* 2009 Jun 20;122(12):1365-8.
74. McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2003 May;60(5):497-502.
75. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders.* 5. ed. Alington: American Psychiatric Publishing; 2013. Tobacco-related disorders of DSM-5; p. 571-577.

76. Belsky DW, Moffitt TE, Baker TB, Biddle AK, Evans JP, Harrington H, Houts R, Meier M, Sugden K, Williams B, Poulton R, Caspi A. Polygenic risk and the developmental progression to heavy, persistent smoking and nicotine dependence. *JAMA Psychiatry*. 2013 May;70(5):534-42. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.736.
77. Prochaska JO, DiClemente CC, Norcross JC. In search of how people change: applications to addictive behaviors. *Am Psychol*. 1992 Sep;47(9):1102-14.
78. Danovitch I. The clinical assessment and treatment of nicotine dependence. *Focus*. 2011;9(1):15-24.
79. Fiore MC, Jaén CR, Baker TB, et al. Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. May 2008.
80. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Quitting smoking among adults: United States, 2001-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011 Nov 11;60(44):1513-9.
81. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th. ed. Arlington: American Psychiatric Publishing; 2000.
82. Organização Mundial da Saúde. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993. p. 69-82.
83. Murphy JM, Monson RR, Olivier DC, Sobol AM, Leighton AH. Affective disorders and mortality: a general population study. *Arch Gen Psychiatry*. 1987 May;44(5):473-80.
84. Kessler RC, Birnbaum HG, Shahly V, Bromet E, Hwang I, McLaughlin KA, Sampson N, Andrade LH, de Girolamo G, Demyttenaere K, Haro JM, Karam AN, Kostyuchenko S, Kovess V, Lara C, Levinson D, Matschinger H, Nakane Y, Browne MO, Ormel J, Posada-Villa J, Sagar R, Stein DJ. Age differences in the prevalence and comorbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World

Mental Health Survey Initiative. *Depress Anxiety*. 2010 Apr;27(4):351-64. doi:10.1002/da.20634.

85. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of 592 population health data. *Lancet*. 2006 May 27;367(9524):1747-57.

86. Anthenelli RC. Nicotine-related disorders. In: Gabbard GO, org. *Gabbard's treatments of psychiatric disorders: DSM-5 Edition*. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing; 2014. p. 871-883.

87. Kendler KS, Neale MC, MacLean CJ, Heath AC, Eaves LJ, Kessler RC. Smoking and major depression: a causal analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 1993 Jan;50(1):36-43.

88. Lyons M, Hitsman B, Xian H, Panizzon MS, Jerskey BA, Santangelo S, Grant MD, Rende R, Eisen S, Eaves L, Tsuang MT. A twin study of smoking, nicotine dependence, and major depression in men. *Nicotine Tob Res*. 2008 Jan;10(1):97-108. doi:10.1080/14622200701705332.

89. McCaffery JM, Papandonatos GD, Stanton C, Lloyd-Richardson EE, Niaura R. Depressive symptoms and cigarette smoking in twins from the national longitudinal study of adolescent health. *Health Psychol*. 2008 May;27(3 Suppl):S207-15.

90. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Apr;83(4):531-41. doi:10.1038/clpt.2008.3.

91. Stahl SM. *Stahls Essential Psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*. 4th. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2013.

92. Rendu F, Peoc'h K, Berlin I, Thomas D, Launay JM. Smoking related diseases: the central role of monoamine oxidase. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jan;8(1):136-47. doi: 10.3390/ijerph8010136.

93. Maes M, Meltzer HY. The serotonin hypothesis of major depression. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press; 1995. p. 933-4.
94. Brady KT, Sinha R. Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. *Focus*. 2007;5(2):229-39.
95. Heffner JL, Strawn JR, DelBello MP, Strakowski SM, Anthenelli RM. The Co-occurrence of cigarette smoking and bipolar disorder: phenomenology and treatment considerations. *Bipolar Disord*. 2011 Aug-Sep;13(5-6):439-53. doi:10.1111/j.1399-5618.2011.00943.x.
96. Shinozaki G, Kumar Y, Rosen BH, Rundell JR, Mrazek DA, Kung S. Diminished association between the serotonin transporter linked polymorphism (5HTTLPR) and body mass index in a large psychiatric sample. *J Affect Disord*. 2013 Oct;151(1):397-400. doi:10.1016/j.jad.2013.06.021.
97. Xu J, Cheng YQ, Chen B, Bai R, Li S, Xu XF, Xu L, Wen JF, Lu ZP, Zeng XF. Depression in systemic lupus erythematosus patients is associated with link-polymorphism but not methylation status of the 5HTT promoter region. *Lupus*. 2013 Sep;22(10):1001-10. doi: 10.1177/0961203313498793.
98. Weiss EM, Freudenthaler HH, Fink A, Reiser EM, Niederstätter H, Nagl S, Parson W, Papousek I. Differential Influence of 5-HTTLPR - Polymorphism and COMT Val158Met - Polymorphism on Emotion Perception and Regulation in Healthy Women. *J Int Neuropsychol Soc*. 2014 May;20(5):516-24. doi: 10.1017/S135561771400023X.
99. Delbrück SJ, Wendel B, Grunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq MA, Berrettini WH, Hoehe MR. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;79(3-4):214-20.
100. Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N. Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics*. 2001 Apr;107(4):690-2.

101. Kenna GA, Roder-Hanna N, Leggio L, Zywiak WH, Clifford J, Edwards S, Kenna JA, Shoaff J, Swift RM. Association of the 5-HTT gene-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with psychiatric disorders: review of psychopathology and pharmacotherapy. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2012;5:19-35. doi: 10.2147/PGPM.S23462.
102. Gerra G, Zaimovic A, Castaldini L, Garofano L, Manfredini M, Somaini L, Leonardi C, Gerra ML, Donnini C. Relevance of perceived childhood neglect, 5-HTT gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysregulation to substance abuse susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Apr 5;153B(3):715-22. doi:10.1002/ajmg.b.31038.
103. Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci*. 2003 Jan;17(2):417-20.
104. Ho MK, Goldman D, Heinz A, Kaprio J, Kreek MJ, Li MD, Munafò MR, Tyndale RF. Breaking barriers in the genomics and pharmacogenetics of drug addiction. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Dec;88(6):779-91. doi: 10.1038/clpt.2010.175.
105. O'Loughlin J, DiFranza J, Tyndale RF, Meshefedjian G, McMillan-Davey E, Clarke PB, Hanley J, Paradis G. Nicotine-dependence symptoms are associated with smoking frequency in adolescents. *Am J Prev Med*. 2003 Oct;25(3):219-25.
106. Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet*. 1997 Dec;101(2):243-6.
107. Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res*. 1993 Sep 10;621(2):311-8.
108. Mihailescu S, Palomero-Rivero M, Meade-Huerta P, Maza-Flores A, Drucker-Colín R. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol*. 1998 Oct 30;360(1):31-6.

109. Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 1999 Sep 17;458(2):171-4.
110. MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):15251-5.
111. Herman AI, Balogh KN. Polymorphisms of the serotonin transporter and receptor genes: susceptibility to substance abuse. *Subst Abuse Rehabil.* 2012 Jun;3(1):49-57.
112. Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria SAS/MS 442/04 de 13 de agosto de 2004. Aprova o Plano de Implantação da Abordagem e Tratamento do Tabagismo no SUS. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 13 ago. 2004 [citado 2014 abr 20]. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/PT-442.htm>.
113. Nunes SOB, Castro MRP. Abordagem intensiva. In: Nunes SOV, Castro MRP, organizadoras. *Abordagem, prevenção e tratamento do tabagismo*. Londrina: EDUEL; 2011. p. 97-116.
114. WHO ASSIST Working Group. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addiction.* 2002 Sep;97(9):1183-94.
115. Silva HIF, De Micheli D, Lacerda RB, Lacerda LA, Formigoni MLOS, HENRIQUE, I.F.S. et al. Validation of the Brazilian version of Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST). *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2004 Jan-Apr;50(2):199-206. Portuguese. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302004000200039>
116. Del-Ben CM, Vilela JAA, Crippa JAS, Hallak JEC, Labate CM, Zuardi AW. Reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version translated

- into Portuguese. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2001 Sep;23(3):156-159. Portuguese.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462001000300008>.
117. Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1960 Feb;23:56-62.
118. Moreno RA, Moreno DH. Hamilton and Montgomery & Asberg depression rating scales. *Rev. Psiquiatr. Clin.* 1998;25(5):262-272. Portuguese.
119. Fagerström KO. Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment. *Addict Behav.* 1978;3(3-4):235-41.
120. Fagerstrom KO, Schneider NG. Measuring nicotine dependence: a review of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *J Behav Med.* 1989 Apr;12(2):159-82.
121. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict.* 1991 Sep;86(9):1119-27.
122. Pomerleau CS, Carton SM, Lutzke ML, Flessland KA, Pomerleau OF. Reliability of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire and the Fagerstrom Test for Nicotine Dependence. *Addict Behav.* 1994 Jan-Feb;19(1):33-9.
123. Carmo JT, Pueyo AA. Adaptation into portuguese for the Fagerström test for nicotine dependence (FTND)to evaluate the dependence and tolerance for nicotine in brazilian smokers. *RBM Rev Bras Med.* 2002 Jan-Feb;59(1/2):73-80. Portuguese.
124. Gaya ICM, Zuardi AW, Loureiro SR, Crippa JAS. Psychometric properties of the Fagerström Test for Nicotine Dependence. *J Bras Pneumol.* 2009 Jan;35(1):73-82.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009000100011>
125. Reichert J, Araújo AJ, Gonçalves CMC, Godoy I, Chatkin JM, Sales MPU, Santos SRRA. Smoking cessation guidelines: 2008. *J. Bras. Pneumol.* 2008 Oct;34(10):845-880. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008001000014>

126. Storr CL, Reboussin BA, Anthony JC. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a comparison of standard scoring and latent class analysis approaches. *Drug Alcohol Depend.* 2005 Nov 1;80(2):241-50.
127. Santos UP, Gannam S, Abe JM, Esteves PB, Freitas Filho M, Wakassa TB, Issa JS Terra-Filho M, Stelmach R, Cukier A. Use of breath carbon monoxide as an indicator of smoking status. *J Pneumol.* 2001 Sep;27(5):231-36. Portuguese. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862001000500001>
128. Klauck SM, Poustka F, Benner A, Lesch KP, Poustka A. Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism? *Hum Mol Genet.* 1997 Dec;6(13):2233-8.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A – Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa sobre “**Centro de Referência em abordagem e tratamento do tabagismo na rede SUS: uma análise do gene transportador de serotonina em cessação do tabagismo**”, que tem por objetivo analisar um determinado tipo de DNA. Este termo de consentimento é para os participantes do Projeto e você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade. Neste projeto nós pretendemos investigar se determinadas regiões do DNA são maiores ou menores entre as pessoas que fumam, pessoas que tinham o hábito de fumar e conseguiram cessar e aqueles que nunca fumaram cigarros na vida.

B – Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de sangue periférico, colhidos em 01 tubo de ensaio totalizando apenas 5 ml de sangue, que serão utilizados para análise do gene transportador de serotonina.

C – Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue obtida será utilizada para obtenção de DNA a qual após a realização deste projeto, ficará armazenada num banco de amostra biológica, o qual ficará a disposição para utilização de outras pesquisas sob coordenação e gerenciamento do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. Todos os projetos que utilizem este material posteriormente a este projeto deverão ser submetidos ao Comitê de Ética para análise e consentimento da pesquisa a ser realizada.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do coordenador do projeto de pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

As pesquisadoras responsáveis Profa.Dra Sandra Odebrecht Vargas Nunes, Enfª Ma Márcia Regina Pizzo de Castro e a Profª. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe vão estudar este gene. As referidas docentes e pesquisadora podem ser encontradas no endereço: Rod Celso Garcia Cid, Campus Universitário da UEL, no Departamento de Clínica Médica, Departamento de Ciências Patológicas e no Ambulatório de Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86060-990, Tel / Fax: (43) 3371-5728. Comitê de Ética em Pesquisa – Tel 3371-2490.

D – Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador (es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste serviço.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do doador: _____

APÊNDICE B - Questionário

AMBULATORIO DE TABAGISMO – AVALIAÇÃO CLÍNICA

Instrumento Número: [][][][][][]. Data da primeira avaliação: ____/____/____

Etiqueta de Identificação

1. População:

01. Tabagista Depressivo
 02. Tabagista Não Depressivo
 03. Depressivo Não Tabagista
 04. Controle Saudável

I - Caracterização Sócio-demográfica da clientela

Nome/Apelido: _____

2. Data de Nascimento: ____/____/____. 3. Idade (em anos):

4. Naturalidade: _____ 5. Gênero: 1. Masculino 2. Feminino

6. Situação conjugal: 1. Solteiro 2. União estável 3. Separado/Divorciado 4. Viúvo

7. Cor da pele: 1. Branca 2. Negra 3. Amarela 4. Mulata 5. Parda 6. Indígena

8. Anos de estudo:

9. Nível de Escolaridade: 01. Analfabeto 02. Alfabetizado 03. Fundamental incompleto

04. Fundamental Completo 05. Médio Incompleto 06. Médio Completo 07. Superior Incompleto

08. Superior Completo 09. Pós-graduação lato sensu 10. Pós-graduação stricto sensu

10. Reside: 1. Sozinho 2. Parceiro 3. Família 4. Familiares 5. Asilo

6. Outros _____

Endereço: _____

Município: _____ CEP: _____ Estado: _____

Telefone Contato: _____ Celular: _____ Ramal: _____

II – Situação de Trabalho 1

13. Local de Trabalho: _____

Endereço: _____

Município: _____ CEP: _____ Estado: _____

14. Formação: _____

15. Profissão: _____ 16. Ocupação: _____

17. Relação com o trabalho: 1. Formal 2. Informal 3. Autônomo 4. Servidor Público

18. Situação trabalhista: 1. Desempregado 2. Auxílio-desemprego 3. Atividade não Remunerada

4. Atividade Remunerada 5. Auxílio-doença 6. Estudante 7. Aposentado 8. Outro _____

19. Possui doença que o afaste do trabalho: 1. sim 2. não

20. Qual é a doença? _____

21. Esta doença torna-o incapaz para o trabalho? 1. sim 2. não
22. No último mês, quantos dias ficou afastado das suas atividades laborais?
23. Qual foi o motivo/doença? _____
24. No último ano, quantos dias ficou afastado das suas atividades laborais? _____
25. Qual foi o motivo/doença? _____
26. Esta doença o incapacitou para as atividades domésticas? 1. sim 2. não
27. Teve alguma internação geral recente: 1. sim 2. não
28. Por quantas vezes foi internado? _____
29. Quantos dias duraram cada internação? _____

III – DADOS DE ENCAMINHAMENTO

32. A procura deu-se: 1. Voluntariamente 2. Por encaminhamento médico ou clínica
 3. Sugestão familiar 4. Sugestão amigo 5. Sugestão colega de trabalho
 6. Outro _____

IV – ABORDAGEM E TRATAMENTO DO TABAGISTA

História Progressiva da Doença

33. (01) Você tem ou teve frequentemente aftas, lesões (feridas) e/ou sangramento na boca?
 1. Sim 2. Não.....
- 33.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
34. (02) Você tem diabetes mellitus?
 1. Sim 2. Não
- 34.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
35. (03) Você tem hipertensão arterial?
 1. Sim 2. Não
- 35.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
36. (04) Você tem ou teve algum problema cardíaco?
 1. Sim 2. Não
- 36.1. Qual? _____
- 36.2. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
37. (05) Você tem ou teve frequentemente queimação, azia, dor no estômago, úlcera ou gastrite?
 1. Sim 2. Não
- 37.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
38. (06) Você tem ou teve algum problema pulmonar?
 1. Sim 2. Não

- 38.1. Qual? _____
- 38.2. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
39. (07) Você tem alergia respiratória?
1. Sim 2. Não
- 39.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
40. (08) Você tem alergia cutânea?
1. Sim 2. Não
- 40.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
41. (09) Você tem ou teve alguma lesão ou tumor maligno?
1. Sim 2. Não
- 41.1. Onde (local)? _____
- 41.2. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
42. (10) Você tem ou teve crise convulsiva, convulsão febril na infância ou epilepsia?
1. Sim 2. Não
- 42.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
43. (11) Você tem anorexia nervosa ou bulimia?
1. Sim 2. Não
- 43.1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
44. (12) Você costuma ter crises de depressão ou ansiedade?
1. Sim 2. Não
44. 1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
45. (13) Você faz ou fez algum tratamento psicológico ou psiquiátrico?
1. Sim 2. Não
45. 1. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....
- 45.2. Qual a medicação? _____
- 45.3. Você já tentou suicídio? 1. Sim 2. Não.....
- 45.4 Quantas vezes?

45.5 Métodos de tentativa de suicídio.....

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Ingestão de medicamento | 5. Arma de fogo |
| 2. Ingestão de organofosforado | 6. Gás |
| 3. Enforcamento | 7. Precipitar-se de alturas |
| 4. Arma branca | 8. Precipitar-se de carro em movimento |
| 9. Outros _____ | |

46. (a) Já fez uso de alguma medicação, mesmo que não prescrita por médico, para dormir ou se acalmar?

1. Sim 2. Não

46.1. Qual? _____

50.3. SCID - Transtorno de Humor.....

- 0- Sem alteração de Humor
- 1- Transtorno Bipolar, tipo Maníaco
- 2- Transtorno Bipolar, tipo Hipomaníaco
- 3- Transtorno Bipolar, tipo Depressivo
- 4- Transtorno Bipolar, tipo Misto
- 5- Transtorno Depressivo Maior, Unipolar
- 6- Transtorno Depressivo Maior, em Remissão
- 7- Transtorno Distímico
- 8- Transtorno de Humor, devido a uma Condição Médica Geral
- 9- Transtorno de Humor, Induzido por Substância
- 10- Transtorno Bipolar em Remissão

57. (15) Você tem ou teve algum outro problema sério de saúde que não foi citado?

1. Sim 2. Não 57.1. Qual? _____

57.2. Está em tratamento? 1. Sim 2. Não.....

57.3. Qual? _____

58. (16) Algum medicamento em uso atual?

1. Sim 2. Não

58.1. Qual? _____

As perguntas 60 e 61 deverão ser respondidas por todos os pacientes do sexo feminino. Se NÃO ir para a questão 62.

60. (18) Está grávida?

1. Sim 2. Não

60.1. Quantos meses? _____

60.2. Número gestações _____

61. (19) Está amamentando?

1. Sim 2. Não

História Tabagística

62. (01) Com quantos anos você começou a fumar ?

--	--

62. (02) Quantos anos fuma:

--	--

62.(03) Quantos cigarros fuma por dia?.....

--	--

62.(04) Anos/Maço. (nºcigarros x anos fumando/20).....

--	--

65. (04) Quantas vezes você tentou parar de fumar?

1. De 1 a 3 vezes 2. Mais de 3 vezes
3. Nunca tentou (*seguir para a questão 69*)

66. (05) Quantas vezes você ficou sem fumar por pelo menos um dia?

1. Uma vez 2. Duas vezes
3. Três vezes 4. Mais de três vezes 5. Nenhuma vez

67. (06) Quais foram os motivos que levaram você a voltar a fumar?(Múltipla escolha)

- | | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| . Bebida..... | <input type="checkbox"/> | . Estressor de Perda..... | <input type="checkbox"/> |
| . Briga – Raiva..... | <input type="checkbox"/> | . Festa..... | <input type="checkbox"/> |
| . Tensão..... | <input type="checkbox"/> | . Alegria..... | <input type="checkbox"/> |
| . Influência..... | <input type="checkbox"/> | . Condicionamento..... | <input type="checkbox"/> |
| . Medo ganhar peso..... | <input type="checkbox"/> | . Ansiedade..... | <input type="checkbox"/> |
| . Sem motivo aparente..... | <input type="checkbox"/> | . Outro..... | <input type="checkbox"/> |

68. (07) Alguma vez na vida utilizou algum recurso para deixar de fumar?

1. Nenhum 2. Apoio de profissional de saúde
3. Leitura em folhetos, revistas, jornais e outros
4. Medicamento

4.1. Qual? _____

5. Outros _____

69. (08) Você participou de algum grupo de apoio para abordagem e tratamento do tabagismo em algum lugar?

1. Sim 2. não

70. Fez uso de tratamento para parar de fumar (pode escolher várias) :

- | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| . bupropiona | <input type="checkbox"/> | . reposição com adesivo | <input type="checkbox"/> |
| . goma | <input type="checkbox"/> | . acupuntura..... | <input type="checkbox"/> |
| . homeopatia | <input type="checkbox"/> | . grupo terapêutico..... | <input type="checkbox"/> |
| . apoio de profissionais de saúde | <input type="checkbox"/> | . outros medicamentos | <input type="checkbox"/> |
| . Qual? _____ | | | |

71. A última vez que ficou abstinente foi por quanto tempo (em meses) _____

--	--	--

72. (09) Por que você quer deixar de fumar agora? (Pode assinalar várias alternativas)

- . Por que está afetando minha saúde
- . Outras pessoas estão me pressionando.....
- . Pelo bem-estar de minha família.....
- . Estou preocupado com minha saúde no futuro.....
- . Porque meus filhos pedem.....
- . Porque não gosto de ser dependente.....
- . Fumar é anti-social.....
- . Porque gasto muito dinheiro com cigarro
- . Fumar é um mal exemplo para as crianças.....
- . Por conta das restrições de fumar em ambientes fechados.....
- . Outros.....

73. (10) Você convive com fumantes na sua casa?

1. Sim 2. Não

73.1. Qual o grau de parentesco? _____

74. (11) Você se preocupa em ganhar peso ao deixar de fumar?

1. Sim 2. Não

Escala de Tolerância de Fagerström – Gravidade à Dependência de Nicotina

75. (01) Quanto tempo depois de acordar fuma o primeiro cigarro?

- 0. Após 60 minutos
- 1. Entre 31 a 60 minutos
- 2. Entre 06 a 30 minutos
- 3. Nos primeiros 5 minutos

76. (02) Você acha difícil não fumar em lugares onde é proibido, como em igrejas, bibliotecas, local de trabalho, shoppings, etc?

1. Sim 0. não

77. (03) Qual o cigarro do dia traz mais satisfação?

1. O primeiro da manhã 0. Outros

78. (04) Quantos cigarros você fuma por dia?

- 0. Menos de 10
- 1. De 11 a 20
- 2. De 21 a 30
- 3. Mais de 31

79. (05) Você fuma mais pela manhã?

1. Sim 0. não

80. (06) Você fuma mesmo doente quando precisa ficar na cama a maior parte do tempo?

1. Sim 0. não

80.1. Pontuação.....

História Familiar de Tabagismo em Primeiro Grau

81. Seu pai fuma ou já fumou? 1. Sim 2. Não
82. Sua mãe fuma ou já fumou? 1. Sim 2. não
83. Número de irmãos? _____ 84. Quantos irmãos fumam?
85. Número de filhos? _____ 86. Quantos filhos fumam?
87. História familiar: 1. Positiva 2. Negativa 3. Desconhece
88. História familiar de transtorno mental: 1.Sim 2. Não
- 88.1. Qual familiar? _____
- 88.2. Qual transtorno mental? _____

Exame Físico – Fase 0

90. Altura do paciente (m): m cm 91. Peso (k): k g
92. IMC – Índice de Massa Corpórea (peso/ altura²):
93. PA: x 94. FC: 95.1 Circunferência Abdominal:
- 95.2 Circunferência Quadril:
100. Glicemia:
- 102.1- Colesterol Total: 102.2- Colesterol HDL:
- 102.3- Colesterol LDL: 102.4- Triglicerídeos:

ASSIST 103. (01) Na sua vida qual dessas substâncias você já usou (Somente uso não médico)

	Não	Sim
103.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	3
103.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	3
103.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	3
103.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	3
103.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	3
103.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	3
103.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	3
103.8. Drogas Alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	3
103.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	3
103.10. Outros, Especificar : _____	0	3

Se NÃO em todos os itens questionar “Nem mesmo quando você estava na escola?”.

Se NÃO em todos os itens, páre a entrevista e vá para a questão 111.

Se SIM para alguma droga, prossiga para a questão 104 para cada droga usada.

104. (02) Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essa(s) substância(s) que mencionou?

	Nunca	1 a 2 vezes	Mensalmente	Semanalmente	Diariamente ou quase todo dia
104.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	2	3	4	6
104.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	2	3	4	6
104.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	2	3	4	6
104.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	2	3	4	6
104.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	2	3	4	6
104.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	2	3	4	6
104.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	2	3	4	6
104.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	2	3	4	6
104.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	2	3	4	6
104.10. Outras, Especifica _____	0	2	3	4	6

Se **NUNCA** em todos os itens da Questão 104, vá para a questão 111.

Se **SIM** para alguns destes itens prossiga respondendo as questões 105 a 110.

105. (03) Durante os três últimos meses, com que frequência você teve um forte desejo ou urgência em consumir? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)

	Nunca	1 a 2 vezes	Mensalmente	Semanalmente	Diariamente ou quase todo dia
105.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	3	4	5	6
105.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	3	4	5	6
105.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	3	4	5	6
105.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	3	4	5	6
105.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	3	4	5	6
105.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	3	4	5	6
105.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	3	4	5	6
105.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	3	4	5	6
105.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	3	4	5	6
105.10. Outras, Especifica _____	0	3	4	5	6

106. (04) Durante os últimos três meses com que frequência o seu consumo de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problemas de saúde, social, legal ou financeiro?

	Nunca	1 a 2 vezes	Mensalmente	Semanalmente	Diariamente ou quase todo dia
106.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	4	5	6	7
106.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	4	5	6	7
106.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	4	5	6	7
106.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	4	5	6	7
106.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	4	5	6	7
106.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	4	5	6	7
106.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	4	5	6	7
106.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	4	5	6	7
106.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	4	5	6	7
106.10. Outras, Especifica _____	0	4	5	6	7

107. (05) (Durante os três últimos meses, com que frequência por causa do seu uso você deixou de (Primeira droga, depois a segunda droga,etc) você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas por você?

	Nunca	1 a 2 vezes	Mensalmente	Semanalmente	Diariamente ou quase todo dia
107.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	5	6	7	8
107.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	5	6	7	8
107.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	5	6	7	8
107.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	5	6	7	8
107.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	5	6	7	8
107.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	5	6	7	8
107.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	5	6	7	8
107.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	5	6	7	8
107.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	5	6	7	8
107.10. Outras, Especifica _____	0	5	6	7	8

108. (06) Há amigos, parentes ou outras pessoas que tenha demonstrado preocupação com seu uso de (Primeira Droga, depois a segunda droga, etc)?

	NÃO, Nunca	SIM, mas não nos últimos 3 meses	SIM, nos últimos 3 meses
108.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	3	6
108.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	3	6
108.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	3	6
108.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	3	6
108.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	3	6
108.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	3	6
108.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	3	6
108.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	3	6
108.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	3	6
108.10. Outras, Especifica _____	0	3	6

109. (07) Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)?

	NÃO, Nunca	SIM, mas não nos últimos 3 meses	SIM, nos últimos 3 meses
109.1. Derivados do tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo de corda ...)	0	3	6
109.2. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, destilados – pinga, uísque ...)	0	3	6
109.3. Maconha (baseado, erva, haxixe ...)	0	3	6
109.4. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem ...)	0	3	6
109.5. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites ...)	0	3	6
109.6. Inalantes (cola de sapateiro, cheirinho-da-loló, tinta, gasolina, éter ...)	0	3	6
109.7. Hipnóticos e sedativos (remédios para dormir, diazepam, lorax ...)	0	3	6
109.8. Drogas alucinógenas (como LSD, ácido, chá-de-lírio, cogumelos...)	0	3	6
109.9. Opióides (heroína, morfina, metadona, coldeína ...)	0	3	6
109.10. Outras, Especifica _____	0	3	6

110. (08) Alguma vez você já usou drogas por injeção? (Apenas uso não médico)

0. NÃO, Nunca
3. SIM, mas não nos últimos 3 meses
2. SIM, nos últimos 3 meses
- 110.1 Pontuação – Hamilton.....
- 110.2 Pontuação - Tabaco
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.3 Pontuação – Bebidas alcoólicas
1. 0-10 2. 11-26 3. 27 ou mais
- 110.4 Pontuação - Maconha
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.5 Pontuação – Cocaína, crack
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.6 Pontuação – Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.7 Pontuação - Inalantes
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.8 Pontuação – Hipnóticos e sedativos
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.9 Pontuação – Drogas alucinógenas
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.10 Pontuação – Opióides
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais
- 110.11 Pontuação – Outras
1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais

137. Sessões Terapêuticas

Situação Paciente (Sit Pac.)

1. Fumante 2. Não fumante 3. Não compareceu
4. Lapso recaída 5. Lapso abstinência 6. Abandono

Tratamento (Tratam.)

01. Grupo 02. Grupo+adesivo 03. Grupo+goma
04. Grupo+adesivo+goma 05. Grupo+bupropriona 06. Grupo+bupropriona+adesivo
07. Grupo+bupropriona+adesivo+goma 08. Grupo+bupropriona+goma
09. Grupo+ISRS 10. Grupo+ISRS+adesivo 11. Grupo+ISRS+goma
12. Grupo+ISRS+goma+adesivo 13. Grupo+nortriptilina 14. Grupo+nortriptilina+goma
15. Grupo+nortriptilina+adesivo 16. Grupo+nortriptilina+adesivo+goma
17. Nenhum 18. Grupo + outro 19. Outro _____

Monóxido de Carbono exalado (CO exal) - PPM e %

	Sit.Pa	Tratam.	CO exal			Sit.Pa	Tratam.	CO exal	
	c.		%	ppm		c.		%	ppm
Avaliação	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	9 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
1 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	10 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	11 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	12 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
4 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	13 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	14 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	15 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	16 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
8 Sessão	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	17 Sess.	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

139.1 Dosagem IL-6 – Fase 0: .

139.2 Dosagem da PCR - Fase 0: .

139.3. 5 HTT – Polimorfismo – Fase 0:

1. 12-12
2. 12-10
3. 10-10
4. 9-12
5. 9-10
6. 9-9

139.4 TNF α – Fase 0:

139.5 IL- 1 - Fase 0: ,

139.6 IL- 4 - Fase 0: ,

139.7 IL- 10 - Fase 0: ,

139.8 Potencial Antioxidante Total Plasmático – (TRAP) - Fase 0: ,

- 139.9 Dialdeído Malônico (MDA) - Fase 0: ,
- 139.10 Óxido Nítrico (NO) - Fase 0: ,
- 139.11 Hidroperóxidos Lipídicos (FOX) - Fase 0: ,
- 139.12 Produtos Avançados de Proteínas Oxidadas (AOPP) - Fase 0: ,
- 139.13 Hb A1c - Fase 0:
- 139.14 α 1 glicoproteína ácida - Fase 0:
- 139.15 Insulina - Fase 0:
- 139.16 Gama GT - Fase 0:
- 139.17 Ácido úrico - Fase 0:
- 139.18 Fibrinogênio - Fase 0:
- 139.19 Homocisteína - Fase 0:
- 139.20 Eletroforese Proteína - Fase 0: , g/dl
 , %
- 139.21 Hemograma Anemia - Fase 0: 1- Normal 2- Alterado
- 139.22 Hemograma Infecção - Fase 0: 1- Normal 2- Alterado
- 139.23 VHS - Fase 0:
- 139.24 Hepatite B - Fase 0: 1- Reagente 2- Não Reagente
- 139.25 Hepatite C - Fase 0: 1- Reagente 2- Não Reagente
- 139.26 HIV - Fase 0: 1- Reagente 2- Não Reagente
- 139.27 TGO - Fase 0:
- 139.28 TGP - Fase 0:
- 139.29 Creatinina - Fase 0:

268.18 Fibrinogênio - Fase 1:

268.19 Homocisteína – Fase 1:

268.20 Eletroforese Proteína – Fase 1: , g/dl
, %

268.21 Hemograma Anemia – Fase 1: 1- Normal 2- Alterado

268.22 Hemograma Infecção – Fase 1: 1- Normal 2- Alterado

268.23 VHS - Fase 1:

268.24 Hepatite B – Fase 1: 1- Reagente 2- Não Reagente

268.25 Hepatite C – Fase 1: 1- Reagente 2- Não Reagente

268.26 HIV – Fase 1: 1- Reagente 2- Não Reagente

268.27 TGO – Fase 1:

268.28 TGP – Fase 1:

268.29 Creatinina – Fase 1:

268.30 Função Pulmonar - Fase 1:

CVF: ICVF%: VEF₁: I VEF₁%: I VEF₁/CVF:

CV: CV%: VVM: l/m VVM%: PF:

l/s

269. Exame Físico – Fase 1:

1. Altura do paciente: m cm 2. Peso: K g

3. IMC – Índice de Massa Corpórea (peso/ altura²):

4. PA: x 5. FC:

9. Circunferência Abdominal: 10. Triglicerídeos:

11. Colesterol Total: 12. Colesterol HDL:

13. Colesterol LDL: 14. Glicemia:

15. Circunferência Quadril:

ANEXOS

ANEXO A- Parecer CEP - Aprovação do Projeto de Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL: 037/2011 CAAE: 0014.0.268.268-11 Processo: 2873/2011 Folha de Rosto: 402088	Londrina, 05 de maio de 2011.
Pesquisador(a): Márcia Regina Pizzo de Castro Unidade/Órgão: CCS – Programa de Doutorado em Ciências da Saúde	
Prezado(a) Senhor(a): O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: <p align="center">"CENTRO DE REFERÊNCIA EM ABORDAGEM E TRATAMENTO DO TABAGISMO NA REDE SUS: uma análise do gene transportado de serotonina em cessação do tabagismo"</p>	
Situação do Projeto: APROVADO Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	