



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZ GUSTAVO PICCOLI DE MELO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *GSTM1* E
GSTT1 EM FUMANTES E NUNCA FUMANTES**

LUIZ GUSTAVO PICCOLI DE MELO

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *GSTM**1* E
*GS**TT**1* EM FUMANTES E NUNCA FUMANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Roberta Losi Guembarovski.

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M528a Melo, Luiz Gustavo Piccoli de.

Análise dos polimorfismos genéticos *GSTM1* e *GSTT1* em fumantes e nunca fumantes / Luiz Gustavo Piccoli de Melo. – Londrina, 2014.
74 f. il.

Orientador: Sandra Odebrecht Vargas Nunes.

Coorientador: Roberta LosiGuembarovski.

Dissertação (Mestrado 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. Fumantes – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) – Teses. 4. Glutathione – Teses. I. Nunes, Sandra Odebrecht Vargas. II. Guembarovski, Roberta Losi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 613.84:575

LUIZ GUSTAVO PICCOLI DE MELO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS *GSTM1* E *GSTT1EM*
FUMANTES E NUNCA FUMANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof. Dr. Michael Maes
Deakin University Australia

Londrina 15 de maio de 2014.

Dedico este trabalho

à Deus e à minha família que soube apoiar-me até mesmo nos momentos mais difíceis.

Luiz Gustavo Piccoli de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Sandra Odebrecht Vargas Nunes e a Prof^a Dr^a Roberta Losi Guembarovski que mais que orientar, conviveram comigo o sonho de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, por ter cedido seu laboratório, equipamentos e equipe para a realização deste trabalho e também por suas valiosas contribuições científicas. Meu muito obrigado.

À minha colega Marcia Regina Pizzo de Castro por estar a meu lado na coleta dos dados e nos exames laboratoriais, além da grande ajuda do Prof. Dr. Heber Odebrecht Vargas.

Agradeço às alunas Julie Massayo Maeda Oda e Leandra Fiori Lopes, do Laboratório de Estudos e Aplicações de polimorfismos de DNA (LEAP), pela grande ajuda no processamento e genotipagem das amostras.

Finalmente, gostaria de agradecer a ajuda de todos que direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho.

MELO, Luiz Gustavo Piccoli. Análise dos polimorfismos genéticos *GSTM1* e *GSTT1* em fumantes e nunca fumantes. 2014. 74f. Dissertação (Mestrado, em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Introdução: O transtorno do tabaco, além de ser a maior causa evitável de doença e morte prematura em todo o mundo, gera como consequência grande impacto econômico devido ao potencial de anos de vida perdidos, perda de produtividade e custos elevados com morte e saúde. Além disso, sabe-se que o tabagismo é um dos principais fatores de risco para várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, pulmonares e vários tipos de câncer. Durante a evolução, a espécie humana tornou-se capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que podem causar danos à saúde. O equilíbrio entre as taxas de absorção e eliminação destes compostos tem um papel importante na prevenção de danos ao DNA. Polimorfismos nos genes que codificam enzimas que promovem conjugação, fundamentais na homeostasia celular, como as glutathione-S-transferases (*GSTs*) e seu papel na suscetibilidade a diversas doenças têm sido extensivamente investigados. Dentre os genes desta superfamília mais estudados encontram-se *GSTM1* e *GSTT1*, os quais são altamente polimórficos por deleção na população humana. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo analisar a possível associação entre polimorfismos dos genes das glutathione-S-transferases (*GSTs*) *GSTM1* e *GSTT1* e o transtorno por uso de tabaco e a cessação do tabagismo entre fumantes e nunca fumantes da Universidade Estadual de Londrina. **Método:** Foi realizado um estudo de associação do tipo caso controle em que foram selecionados 182 portadores do transtorno por uso de tabaco, recrutados do Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo (CRATT), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e 182 nunca fumantes recrutados na mesma instituição. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEL. Os participantes foram submetidos a um questionário estruturado para avaliar as características sócio-demográficas, clínicas, doenças relacionadas ao uso do tabaco, tais como doença cardiovascular, câncer, diabetes e doenças pulmonar. Foi avaliado o Índice de massa corpórea, bem como o uso de álcool, sedativos e história familiar de transtorno por uso de tabaco. O diagnóstico de transtorno por uso de tabaco foi realizado por entrevista clínica estruturada, na versão clínica (SCD-1), baseada no DSM-IV. A cessação do tabagismo foi avaliada utilizando monóxido de carbono exalado. A partir do sangue periférico, os DNAs genômicos de pacientes e controles foram extraídos por Kit (Biometrix, Biopur, Curitiba, PR) e os polimorfismos genéticos foram avaliados através de Reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex, segundo um protocolo padrão. Foram feitas comparações utilizando análises univariadas e multivariadas. Foram utilizadas as análises de Regressão Logística Binária e Multivariada. **Resultados:** A análise de regressão logística mostrou uma associação significativa (efeito protetor) entre o transtorno do uso do tabaco e os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, quando realizado o ajuste para anos de escolaridade, idade, sexo, estado civil e etnia. Não houve associação significativa entre os polimorfismos *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTT1/M1* e altas pontuações no teste de Fagerström para Dependência de Nicotina, idade de início do uso do tabaco, cessação do tabagismo após 52 semanas ou histórico

familiar de tabagismo. Pacientes com Transtorno por uso de Tabaco tinham mais doença cardiovascular, hipertensão, doenças pulmonares e uma história familiar de tabagismo, em comparação aos controles. O genótipo nulo *GSTT1* esteve associado com aumento do risco de hipertensão arterial. Os resultados mostraram que o polimorfismo do gene *GSTM1* e talvez do gene *GSTT1* podem conferir proteção contra o transtorno por uso do tabaco. **Conclusão:** Os polimorfismos analisados nos genes das GSTs mostraram-se positivamente associados ao tabagismo (efeito protetor), mas não com a tentativa de cessação do tabaco. Diante disso, descreve-se um novo paradigma que liga os efeitos periféricos dos genótipos nulos das GSTs (efeitos protetores) com os efeitos centrais dos polimorfismos genéticos dos genes responsáveis pelo circuito da recompensa relacionando-os com os efeitos fisiopatológicos do Transtorno por Uso do Tabaco.

Palavras-chaves: Transtorno por Uso de tabaco. Polimorfismo genético. Glutathione-S-Transferase. *GSTM1*. *GSTT1*. Cessação do tabagismo.

MELO, Luiz Gustavo Piccoli. An analysis of genetic polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes in smokers and non-smokers. 2014. 74f. Dissertation (Master of Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Introduction: Tobacco use disorder is the most important preventable cause of disease and premature death worldwide. Tobacco use disorder therefore generates a significant economic impact due to the potential years of life lost, lost productivity and high costs of death and healthcare. Furthermore, it is known that smoking is a major risk factor for several chronic diseases such as cardiovascular and pulmonary diseases and cancers. During evolution, the human species has become able to metabolize a large number of chemical compounds that can cause damage to health. The balance between the rates of absorption and elimination of these compounds play an important role in preventing DNA damage. Polymorphisms in genes that encode enzymes, which promote conjugation, are fundamental to cellular homeostasis. One of those, i.e. the glutathione-S-transferases (GSTs), play a role in the susceptibility to various diseases and have been extensively investigated. Among the most investigated genes of this superfamily are GSTM1 and GSTT1, which are highly polymorphic by deletion in the human population. **Objective:** This study aimed to analyze the possible association between polymorphisms in the genes of GSTM1 and GSTT1 and tobacco use disorder and smoking cessation among current tobacco users and never-smokers at Londrina State University. **Method:** A case-control study was done and comprised 182 outpatient tobacco users recruited from the Centre of Treatment for Smoking Cessation and 182 never-smokers recruited from the same institution. The study was approved by the ethical research committee at UEL. Diagnosis of tobacco use disorder was assessed through structured clinical interview, based on DSM-IV, clinical version SCD-1. Smoking cessation was evaluated by using exhaled carbon monoxide. A structured questionnaire was used for socio-demographic and clinical data, such as medical history of tobacco-related diseases (obstructive pulmonary disease, stroke, coronary heart disease, cancer, hypertension and diabetes). We also measured body mass index (BMI), as well as alcohol and sedative use, and family history of tobacco use disorder. Genetic polymorphisms was evaluated by polymerase chain reaction, Multiplex, according to a standard protocol. Data were analyzed using univariate and multivariate statistical analyses. Using logistic regression analysis we calculated the Odds Ratios (ORs) and 95% Confidence Intervals (95% CI). **Results:** Logistic regression analysis showed a significant association between tobacco use disorder and the GSTM1 and the GSTT1 null genotypes, while adjusting for years of education, age, gender, marital status and ethnicity. There was no significant association between GSTT1, GSTM1 and GSTT1/M1 genotypes and high scores on the Fagerström Test for Nicotine Dependence scale, age at onset of tobacco use, smoking cessation (by week 52) or a family history of smoking. Patients with tobacco use disorder had cardiovascular disease, hypertension, lung disease and a family history of smoking, as compared to control subjects. The GSTT1 null genotype increased risk to hypertension. The results show that the GSTM1 and maybe the GSTT1 null genotypes may confer protection against tobacco use disorder. **Conclusion:** The results show that the GSTM1 and maybe the GSTT1 null genotypes may confer protection against tobacco use

disorder. We describe a new paradigm that links the peripheral effects of null (protective) and wild GST genotypes with the central effects of reward gene variants with tobacco use disorder and the pathophysiological effects of tobacco use disorder on medical disorders.

Keywords: Tobacco Use Disorder. Genetic polymorphism. Glutathione-S-transferase. GSTM1. GSTT1. Smoking cessation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHC	Ambulatório do Hospital de Clínicas
ASSIST	Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test
A118G	Polimorfismo do gene do receptor μ -opióideOPRM1
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos EUA
COex	Monóxido de Carbono Exalado
COMT	Catecol O-Metiltransferases
CRATT	Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo
CYP	Enzima do Citocromo P-450
CYP2D6	Gene da Enzima do Citocromo P-450 - 2D6
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais- 4a edição
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais-5aedição
DRD1	Receptores De Dopaminatipo 1
DRD2	Receptores De Dopaminatipo 2
DRD3	Receptores De Dopaminatipo 3
DRD4	Receptores De Dopaminatipo 4
DRD5	Receptores De Dopamina tipo 5
EDTA	ÁcidoEtilenodiamino Tetra-Acético
Eros	Espécies reativas de oxigênio
FTND	Teste de dependência de Nicotina de Fagerström
GSTs	Glutaciona S- transferase
GSTM1	Glutaciona S- transferase Mu 1
GSTT1	Glutaciona S- transferaseTheta 1
GSH	Glutaciona
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
MS	Ministério da Saúde
NAT	N-Acetil-Transferase
nAChR	Receptores Colinérgicos Nicotínicos
OPRM1	Gene Do Receptor μ -Opióide
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
SCD -1	Entrevista clínica estruturada, baseada na versão clinicado DSM-IV

SERT	Gene Transportador de Serotonina
SLC6AC9	Gene transportador de dopamina
TUD	Tobacco Use Disorder
UEL	Universidade Estadual de Londrina
5-HTTLPR	Polimorfismo Do Gene Transportador De Serotonina Por Deleção Do Alelo S

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	SISTEMA DE METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS: GENES GSTM1 E GSTT1	15
1.2	GENES GSTM1 E GSTT1 E TRANSTORNO POR USO DO TABACO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	21
3.2	LOCAL DO ESTUDO	21
3.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA	21
3.4	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	22
3.5	PERÍODO DE COLETA DE DADOS	22
3.6	INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS	22
3.6.1	Questionário	22
3.6.2	Triagem de Uso de Sustâncias Psicoativas	22
3.6.3	Triagem da Gravidade da Dependência de Nicotina	23
3.6.4	Anos –Maço	23
3.6.5	Índice de Massa Corpórea	23
3.6.6	História Familiar	23
3.6.7	Monóxido de Carbono Exalado (COex)	24
3.7	ANÁLISE MOLECULAR	24
3.7.1	Obtenção das Amostras e do DNA Genômico	24
3.7.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	ARTIGO	27

		13
5	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6	ANEXOS	50
6.1	PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	50
6.2	ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	51
6.3	ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO: AMBULATÓRIO DE TABAGISMO - AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	53
7	TABELAS E FIGURAS	66
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde, em sua décima versão da classificação internacional das doenças, classifica como F.17 os Transtornos mentais e de comportamento decorrentes do uso de tabaco (1). Em sua última versão, o DSM-5 (Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais- 5ª edição) classifica como transtorno por uso de tabaco, um padrão problemático de uso que piora significativamente o funcionamento do indivíduo. Esse transtorno pode levar a abstinência que é caracterizada pelo surgimento, após 24 horas da cessação ou redução do uso de uma determinada quantidade de nicotina, de pelo menos quatro dos seguintes sinais e sintomas: 1) irritabilidade, raiva ou frustração, 2) ansiedade, 3) dificuldade de concentração, 4) aumento do apetite, 5) inquietação, 6) humor deprimido e 7) insônia (2).

Este é um transtorno que além de ser a maior causa evitável de doença e morte prematura em todo o mundo, gera como consequência grande impacto econômico devido ao potencial de anos de vida perdidos, perda de produtividade e custos elevados com mortes e cuidados de saúde (3, 4). Sabe-se que o tabagismo é um dos principais fatores de risco para várias doenças crônicas, como a doença cardiovascular, a doença pulmonar obstrutiva crônica e o câncer (5). Já as comorbidades psiquiátricas mais comuns são os transtornos por uso de álcool e outras substâncias. As consequências médicas do consumo de tabaco, muitas vezes começam quando os usuários estão na faixa dos 40 anos e, geralmente, tornam-se progressivamente mais debilitantes ao longo do tempo (2).

O mecanismo de dependência do transtorno por uso do tabaco está associado com a ativação da via de recompensa cerebral, o sistema dopaminérgico mesolímbico, originado da área tegumentar ventral do mesencéfalo, com projeções para o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal (6). A nicotina aumenta a atividade dos neurônios na área tegumentar ventral através da ativação dos receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) e facilita assim a liberação de dopamina nesse sistema (7).

A ativação da via dopaminérgica é responsável pelo efeito reforçador positivo, que inclui relaxamento, redução do estresse, aumento do estado de vigília, melhora da função cognitiva, modulação do humor e perda de peso. O efeito reforçador negativo refere-se aos sintomas de retirada da nicotina, que inclui nervosismo, irritabilidade, ansiedade, concentração e função cognitiva prejudicada, além do ganho de peso (7).

Estudos genéticos sugerem que o transtorno do uso do tabaco é um comportamento complexo que inclui um grande número de estágios da dependência, como a vulnerabilidade à iniciação, uso continuado, propensão a tornar-se dependente, cessação e recaída. A maioria dos estudos sobre o hábito de fumar se concentrou em genes das vias de recompensa e do metabolismo da nicotina, com um grau de herdabilidade de cerca de

50% (8-11).

Os genes mais estudados na rota dopaminérgica envolvida com o sistema de recompensa cerebral são os que regulam o fluxo de dopamina no sistema nervoso central. Entre eles, os genes que codificam os cinco receptores diferentes de dopamina (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* e *DRD5*). Desses, o gene *DRD2* é o mais investigado. Existem evidências de que os indivíduos com redução dos receptores D₂ no estriado são mais propensos a encontrar reforço e prazer em uso de substâncias psicoativas(12). Por exemplo o polimorfismo do gene *DRD2 Taq1A*, localizado no cromossomo 11q21-22, está associado com déficit na regulação da dopamina através da redução desses receptores no estriatum e tem sido associado com a iniciação do tabagismo, maior grau de dependência e maior dificuldade na cessação do tabaco. O polimorfismo do gene *DRD4* tem sido associado com o início do hábito de fumar, além de uma maior predisposição ao tabagismo em afrodescendentes, mas não em caucasianos. Porém a associação dos polimorfismos dos genes *DRD1*, *DRD3* e *DRD5* com o hábito de fumar tem sido controversa na literatura (13, 14).

Outro gene que tem sido estudado é o do transportador de dopamina (*SCL6A3*), relacionado com a produção da proteína DAT1, uma proteína transmembrana de canais Na/Cl-dependentes, muito importante na regulação da transmissão dopaminérgica. Os indivíduos que apresentaram o polimorfismo *SLC6A3*, com uma repetição de 10 alelos cujo o impacto funcional ainda não está muito bem compreendido, tiveram maior facilidade na cessação do tabagismo (14). Existe também, uma possível associação entre os alelos polimórficos que codificam uma alta atividade enzimática da COMT (Catecol O-Metiltransferases), enzima relacionada com o metabolismo da dopamina. Indivíduos com o genótipo polimórfico *MET/MET*, associado com baixa atividade enzimática, eram menos propensos ao transtorno por uso de tabaco, porém esses resultados não foram replicados (14).

Sabe-se que a nicotina aumenta a secreção de serotonina além de modular a via dopaminérgica e, portanto, a via serotoninérgica começou a ser relacionada com a via de recompensa cerebral. O transportador de serotonina (5-HTT) está envolvido na recaptção de serotonina nas sinapses no cérebro e consequentemente modula a duração e magnitude da neurotransmissão na fenda sináptica. O gene 5-HTT, localizada no cromossomo 17q11.2, possui um polimorfismo na sua região promotora, chamada 5-HTTLPR (Serotonin Transporter Linked Polymorphic Region), podendo ser uma inserção ou deleção, que confere um alelo curto (s) ou longo (l)(15). Assim observou-se que o polimorfismo do *SERT* (Gene Transportador de Serotonina) por deleção do alelo S (5-HTTLPR) esteve associado com a iniciação do tabagismo em adolescentes provavelmente devido aos altos traços de neuroticismo que estes indivíduos possuíam(13, 14).

Ainda sobre as vias de recompensa, sabe-se que o receptor μ -opióide é o sítio primário de ação das β -endorfinas ao promoverem os efeitos de recompensa através de modulação da via dopaminérgica. Sabe-se que a nicotina estimula esses receptores opióides endógenos no cérebro e pode modular indiretamente a via de recompensa cerebral e o polimorfismo *A118G* do gene do receptor μ -opióide (*OPRM1*) esteve associado com a dependência de nicotina (13).

Já em relação ao metabolismo da nicotina, outro gene muito citado é o polimorfismo do gene *CYP2A6* que faz a regulação hepática da enzima transformadora de nicotina em cotinina. Assim, indivíduos que metabolizam mais lentamente a nicotina são menos propensos a iniciar o hábito de fumar, pois tendem a experimentar mais efeitos adversos com o uso do tabaco (14). Foram realizados também, vários estudos com o polimorfismo do gene *CYP2D6* que está associado com metabolização rápida da nicotina. Foi visto que fumantes com esse polimorfismo fumavam em maior quantidade (14). Outros estudos têm demonstrado associação entre as variantes de subunidade do gene receptor de nicotina colinérgico *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*, localizado no cromossomo 15q24-25.1, com o aumento do risco de dependência da nicotina e de câncer de pulmão em populações de ascendência Europeia e Africana (16).

1.1 SISTEMA DE METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS: GENES *GSTM1* E *GSTT1*

Durante a evolução, a espécie humana se tornou capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que se acumulam nas células e podem causar danos para a saúde. O metabolismo é o principal mecanismo para manter a homeostasia durante a exposição dos organismos aos xenobióticos. O equilíbrio entre as taxas de absorção e eliminação dos mesmos tem um papel importante na prevenção dos danos no DNA (Ácido Desoxirribonucleico) (17).

Dentro deste contexto, variações no metabolismo individual têm sido relacionadas à variantes alélicas (polimorfismos genéticos) em genes que codificam enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de carcinógenos químicos, as quais, muitas vezes, estão correlacionadas à suscetibilidade a determinados tipos tumorais e a outras patologias (17, 18). Dentre estes carcinógenos químicos, encontra-se o benzo(a)pireno, um potente carcinógeno presente na fumaça do cigarro, que é transformado em benzopireno diol epóxido (BPED), um composto altamente reativo, capaz de formar ligações covalentes com o DNA podendo causar mutações (19).

Para evitar o excesso de produtos potencialmente carcinogênicos nas células, o organismo desenvolveu diversas vias de eliminação de compostos xenobióticos.

Apesar do grande número de enzimas necessárias para reconhecer e metabolizar esses compostos, a biotransformação foi didaticamente dividida em duas etapas. A fase I consiste na metabolização de compostos estranhos ao organismo. Já na fase II da biotransformação, as enzimas conjugam compostos hidrofílicos, como o acetil ou a glutationa, tornando-os mais hidrossolúveis e permitindo que sejam facilmente eliminados do organismo (20).

Assim, as substâncias presentes no tabaco, como a maioria dos xenobióticos, são metabolizadas por um complexo enzimático composto por enzimas ativadoras (fase I) e detoxificadoras (fase II). As enzimas da fase I são codificadas principalmente pela família de genes do citocromo P-450 (*CYPs*), enquanto que as enzimas da fase II incluem as (*GSTs*) Glutaciona-S-transferases e as N-acetil-transferases (*NATs*) (21).

Dentre as enzimas da fase II, as *GSTs* desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, tanto pela conjugação com moléculas endógenas, como as glutacionas, como por ligação não covalente com vários agentes xenobióticos presentes, por exemplo, na fumaça do cigarro e na dieta alimentar, impedindo a ligação destes com o DNA (22).

Estima-se que existam pelo menos 20 *GSTs* na espécie humana, além disso, sabe-se que as *GSTs* estão presentes em plantas, ratos, insetos e mamíferos, sendo conservadas evolutivamente(23, 24). Existem duas grandes superfamílias das *GSTs*, as solúveis, relacionadas com a metabolização de xenobióticos e as microsossomais, relacionadas com a metabolização do ácido araquidônico(25). A superfamília solúvel é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais, que podem se conjugar a moléculas eletrofílicas tornando-as menos tóxicas (26). Sua maior concentração é observada no fígado, contudo, é encontrada também em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado. As enzimas microsossomais são formadas por proteínas triméricas e ficam localizadas na membrana de células de vários órgãos como o fígado, coração e pulmão (25).

As *GSTs* humanas solúveis foram agrupadas em sete grandes classes Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta e Omega. As proteínas de cada classe são nomeadas com a letra inicial dos nomes de cada classe (24).Esta classificação leva em consideração a especificidade do substrato enzimático além de outras características enzimáticas como a afinidade química, estrutura, sequência de aminoácidos e o comportamento cinético de determinada enzima (27).

Dentro da família das *GSTs* existem genes que são polimórficos na população humana, como aquele que codifica para a enzima GSTP1, a qual está envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de algunsPAHs(Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)(28).Board et al.,

1990(29)descreveram três diferentes alelos para este gene, de modo que os alelos variantes *GSTP1*B* e *GSTP1*C* levam a trocas de aminoácidos com consequente alteração da atividade catalítica substrato-específica e estabilidade térmica das respectivas proteínas(30).

Outros dois genes desta mesma família, *GSTT1* e *GSTM1*, os quais também codificam enzimas de fase II e são polimórficos na população humana, têm sido bastante estudados no contexto da carcinogênese e em relação a outras doenças humanas complexas, e foram os temas escolhidos para serem abordados neste estudo.

A enzima *GSTM1* tem função de detoxificação de compostos eletrofílicos, hidrocarbonetos, compostos aromáticos policíclicos e outros mutagênicos. Estudos mostram que cerca de 42,1% da população brasileira possui a deleção para esse gene, sendo que essa mutação pode estar associada ao aumento do risco de câncer, devido à maior suscetibilidade a substâncias cancerígenas, podendo também estar relacionada à menor resposta ao tratamento medicamentoso, por afetar a eficácia de certas drogas (31, 32).

Geralmente os genes da classe Mu são compostos por 8 exons (com exceção de 9 exons da *GSTM3*) e possuem um comprimento variando de 6 à 16 kb (24). O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico por deleção na população humana, possuindo dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*), que diferem por uma única base na sequência do DNA e possuem a mesma eficácia de detoxificação, e um alelo com atividade nula por deleção completa do gene (*GSTM1*0*)(33).

O gene *GSTT1*, localiza-se no cromossomo 22q11.23 e possui um comprimento de 8.1 kb, sendo também polimórfico por deleção completa ou parcial do gene, com consequente ausência da respectiva enzima(24, 27).A *GSTT1* está relacionada com reações de ativação e detoxificação de produtos químicos industriais, e é encontrada nos eritrócitos, nas células bronquiolares e em baixos níveis no fígado. O gene que codifica essa enzima apresenta genótipo nulo por deleção em 25,4% da população brasileira, podendo, desta forma, colaborar com a suscetibilidade individual ao câncer (31, 34).

A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em 20 a 70% nas diferentes populações mundiais, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (35, 36).

De um modo geral, variantes alélicas polimórficas em genes que codificam enzimas envolvidas com processos metabólicos podem alterar a expressão ou a função enzimática, levando a um aumento ou a uma diminuição na ativação e detoxificação de carcinógenos. Tais enzimas possuem um importante papel na metabolização de um grande número de compostos, como os encontrados na dieta e na fumaça do cigarro, atuando, consequentemente, na manutenção da integridade genômica(37). Sabe-se também que, muitos compostos requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, é provável que variações individuais no metabolismo influenciem na formação de aductos no material

genético, com importantes implicações fisiológicas, como em processos de formação de tumores (38).

Uma vez que a carcinogênese, bem como outras doenças de caráter multifatorial (incluindo o transtorno do tabaco) são influenciadas por vários genes, uma única variante polimórfica possui, individualmente, um efeito pequeno, justificando a realização da análise de variantes simultaneamente (39). O impacto de um único polimorfismo genético pode ser pequeno ou inexistente, mas a análise de interações entre variantes genéticas pode evidenciar uma suscetibilidade maior ou menor a um determinado caráter. Como exemplo destas interações, tem sido sugerido uma maior suscetibilidade para indivíduos que possuem simultaneamente os genes *GSTM1/GSTT1* nulos (40).

Assim, devido ao fato destas enzimas atuarem no metabolismo dos compostos que compõem o cigarro, o estudo das variantes genéticas descritas nos respectivos genes é de grande interesse na busca por marcadores associados ao transtorno por uso de tabaco, bem como na dificuldade em abandonar o vício.

1.2. GENES *GSTM1* E *GSTT1* E TRANSTORNO POR USO DE TABACO

Sabe-se que a fumaça do cigarro contém milhares de compostos que aumentam o estresse oxidativo nas células. As *GSTs* realizam uma variedade de funções nas células tais como a remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs), regeneração das proteínas S-tioladas e protegem contra a peroxidação lipídica, ambos sendo consequências do estresse oxidativo (41, 42). Além disso, previnem a ligação de compostos químicos prejudiciais (xenobióticos) à moléculas como DNA e RNA, reduzindo assim mutações no genoma das células (21, 43).

A relação do genótipo nulo *GSTM1/GSTT1* combinado e o transtorno por uso do tabaco tem sido apontado como fator de risco para uma grande variedade de doenças, incluindo a susceptibilidade para a doença arterial coronariana (36, 43-51), doenças pulmonares (52), doença cerebrovascular (53, 54), diabetes tipo 2 (46, 55) e o câncer (Pulmão, bexiga, mama e colorretal) (56, 57). Outros estudos, no entanto, mostraram que não há associação entre os genótipos nulos dos genes *GSTM1/GSTT1* e risco de doença cardíaca isquêmica (58) ou mesmo a outros tumores malignos (carcinoma de cavidade oral e melanoma) (59-61).

As doenças relacionadas com o tabaco, tais como a doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes estão associados com transtorno depressivo por compartilharem as vias da inflamação e do estresse oxidativo (62, 63). Dentro deste contexto, polimorfismos nos genes das glutatona S-transferases podem

estar associados à doenças relacionadas ao tabaco e aquelas relacionadas à inflamação, por meio de aumento do estresse oxidativo e da própria inflamação (42, 64).

A hipótese do presente estudo envolve avaliar se existe associação entre polimorfismos em genes pertencentes à família das *GSTs* (*GSTM1* e *GSTT1*) com o transtorno do tabaco. Também, se a presença ou ausência das mutações estão associadas com início precoce, maior risco de recaída, maior gravidade da dependência e dificuldade na cessação do tabagismo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a possível associação entre os polimorfismos presentes nos genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação ao transtorno por uso do tabaco e cessação do tabagismo, entre fumantes e nunca fumantes da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar as características sócio-demográficas e clínicas entre fumantes do Centro de Referência de Abordagem e Tratamento do Tabagismo (CRATT), localizado no Ambulatório do Hospital de Clínicas (AHC) e nunca fumantes da mesma instituição;
- b) Comparar as doenças relacionadas ao tabagismo entre fumantes e nunca fumantes;
- c) Avaliar a possível associação de polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* quanto ao transtorno por uso de tabaco através de um estudo do tipo caso-controle, envolvendo fumantes e nunca fumantes;
- d) Avaliar a possível associação entre estes mesmos polimorfismos e os parâmetros: escores no Teste de dependência de Nicotina de Fagerström (maior que 6), início do uso do tabaco, número de cigarros fumados por dia, cessação após 52 semanas e história de tabagismo na família.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro CONEP 5231/Plataforma Brasil No. CAAE 126797113300000231). Todos os participantes receberam as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, para posterior coleta do material. **(Anexo 1)**.

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O delineamento refere-se a um estudo de caso-controle. Numa segunda etapa, foi realizado um estudo transversal para a avaliação dos parâmetros de dependência ao tabaco em relação aos marcadores genéticos, apenas no grupo dos pacientes.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no CRATT, localizado no AHC, da UEL. O CRATT foi implantado no AHC/UEL é credenciado pelo Ministério da Saúde, de acordo com a Portaria SAS/MS 442/04 (65).

A abordagem e o tratamento do fumante consistem em 16 sessões de grupos terapêuticos, entre 10 a 15 participantes, de uma hora e meia de duração. Previamente, realiza-se a consulta inicial de avaliação clínica do fumante. Associa-se, de acordo com a necessidade, a farmacoterapia de reposição de nicotina e bupropiona. As sessões grupais foram estruturadas, sendo quatro sessões semanais, passando a duas sessões quinzenais, e uma sessão mensal para prevenção de recaída, até completar um ano. As sessões foram igualmente eficazes para ambos os sexos (66).

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP), coordenado pela Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, do Centro de Ciências Biológicas da UEL.

3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

O estudo utilizou um banco de dados que vem sendo formado de dados coletados de pacientes fumantes (n=182) do CRATT, localizado no AHC/UEL e definidos conforme o questionário estruturado baseado no DSM-IV(SCD1)(67). Nunca fumantes foram constituídos da comunidade de funcionários da UEL (n= 182) e definidos conforme o

critério do CDC(68).

Os critérios de inclusão foram: ambos os sexos, todas as etnias, idade entre 18 e 65 anos, e consentimento de participação voluntária no estudo.

Os critérios de exclusão foram: presença de delírio, demência, amnésia e outros transtornos cognitivos, entrevistas, questionários e/ou genotipagem incompletos.

3.4 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

A amostra estimada foi de aproximadamente 360 indivíduos utilizando um índice de confiança de 95% e a prevalência de 40-60% de polimorfismos nos genes *GSTM1/GSTT1* presentes na população, com um poder de 82%.

3.5 PERÍODO DE COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados entre março/2011 e julho/2012. Durante o período entre abril/2013 e outubro/2013 foram realizadas revisão de dados em prontuários e realização de questionários que não foram preenchidos no período anterior de coleta sanguínea.

3.6 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

Para a coleta de dados foram utilizados os seguintes instrumentos :

3.6.1 Questionário

Os participantes responderam a um questionário estruturado constando os seguintes dados: sócio-demográficos, clínicos, hábito tabagístico e doenças relacionadas ao tabaco como as doenças cardiovasculares, pulmonares, câncer e diabetes (**Anexo 2**).

3.6.2 Triagem de Uso de Substâncias Psicoativas

Para o rastreamento, utilizou-se o questionário ASSIST (Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test) desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde para pessoas que fazem uso de substâncias psicoativas, que abrange: tabaco, álcool, canabinóides, cocaína, estimulantes do tipo anfetamina, sedativos, alucinógenos,

inalantes, opióides e outras drogas (69). Esse teste foi traduzido e adaptado para o português por Henrique e colaborado sendo constituído de oito questões as quais abordam a frequência de uso na vida e nos três últimos meses, problemas relacionados ao uso, preocupação a respeito do uso por parte de pessoas próximas ao usuário, prejuízo na execução de tarefas esperadas(70). Para rastreio do uso do álcool utilizou-se a seguinte pontuação: baixo risco (0-10), moderado risco (11-26) sendo oferecido uma intervenção breve e alto risco (≥ 27) sendo oferecido intervenção intensiva.

3.6.3 Triagem da Gravidade da Dependência de Nicotina

O teste de Fagerström para Dependência da Nicotina (FTND) foi utilizado para avaliar a gravidade da dependência de tabaco (71). O teste foi traduzido e adaptado para a língua portuguesa por Carmo e Pueyo (72). O FTND possui uma escala de seis itens e a pontuação de 0 a 10.

Os escores para dependência de nicotina permitem a classificação 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). O ponto de corte de FTND para a dependência de nicotina foi ≥ 5 (73-75).

3.6.4 Anos- Maço

O número de anos-maço foi calculado de acordo com a definição: o número de cigarros fumados por dia multiplicado pelo número de anos fumados dividido por 20 (1 pacote tem 20 cigarros).

3.6.5 Índice de Massa Corpórea

O Índice de Massa Corpórea foi calculado dividindo-se peso(kg) por altura²(m²).

3.6.6 História Familiar

A história familiar do tabagismo constou de relato do transtorno por uso do tabaco em membros de primeiro grau de fumantes e nunca fumantes.

3.6.7 Monóxido de Carbono Exalado (COex)

A medida CO no ar exalado (COex) é atualmente 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 (76). Essa medida foi realizada após cada uma das 16 sessões de tratamento, em um analisador MicroCO Meter da Micro Medical Limited, Rochester, RU. O ponto de corte para o COex foi de > 6 ppm para fumantes e <6 ppm para nunca fumantes e serviu para a avaliação de cessação do tabagismo (77).

3.7 ANÁLISE MOLECULAR

3.7.1 Obtenção das Amostras e do DNA Genômico

Foram obtidas de cada participante da pesquisa amostras de sangue (5 ml) coletadas a vácuo, por aspiração mecânica automática (Vacutainer), com agulhas e tubos descartáveis estéreis contendo anticoagulante EDTA.

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL de sangue periférico total pelo Kit de Extração Mini Spin Plus (BioPur, Curitiba, Paraná, BR) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, USA) nos comprimentos de onda 260/280nm.

3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de co-amplificação em cadeia pela polimerase foi realizada para análise da presença ou ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* baseada no protocolo de PCR Multiplex de Abdel-Rahman, 1996(78), modificado, nas seguintes condições: tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 10 pmol de cada iniciador; 1,25 U de Taq DNA polimerase; 200-300 mM de dNTPs; 100ng de DNA genômico total e água ultra-pura estéril para completar o volume final de 25 µl. Os fragmentos foram amplificados em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) e submetidos à eletroforese (3V/ml) em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. Para a confirmação do tamanho dos produtos amplificados, foram utilizados marcadores de tamanho de fragmento de DNA (Ladder) de 100 pares de base (pb).

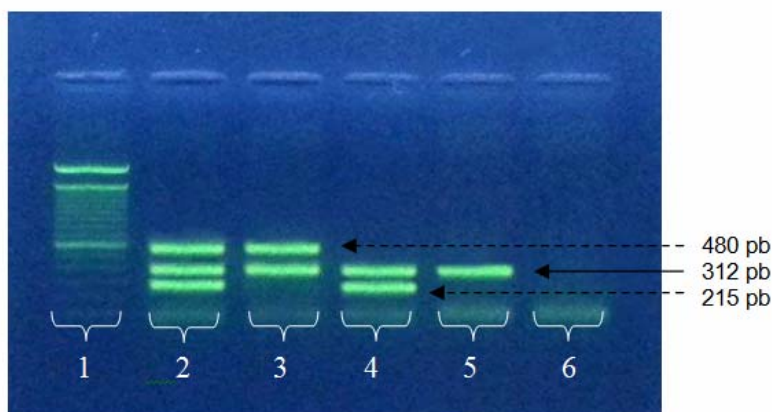
Foi usado como controle interno da reação o gene *CYP1A1*. Os iniciadores para este gene amplificam um fragmento não polimórfico de 312 pb (**Tabela 1**). Os

fragmentos de 215 e 480 pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene ou para ambos (**Tabela 1, Figura 1**).

Tabela 1 - Iniciadores e condições de amplificação para os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Gênes	Iniciadores	Condições da reação
<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> deleção	<i>GSTM1</i> : 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'	94°C-5 min 30 ciclos (94°C-1 min, 59°C-1 min, 72°C-1 min) 72°C-5 min
	<i>CYP1A1</i> : 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'	
	<i>GSTT1</i> : 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'	

Figura 1 - Perfil de eletroforese para os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. 1) marcador de peso molecular de 100pb (Ladder); 2) genótipos *GSTT1*/*GSTM1* positivos; 3) genótipo *GSTT1* positivo; 4) genótipo *GSTM1* positivo; 5) genótipo duplo negativo; 6) controle interno da reação (branco).



3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas para examinar a relação entre fumantes e nunca fumantes. Foram feitas comparações entre os dados sócio-demográficos, clínicos e de genotipagem, utilizando testes paramétricos adequados nos quais os dados foram distribuídos normalmente e testes estatísticos não-paramétricos para os dados categóricos ou não-normais.

As associações entre os genes polimórficos nulos e os genes presentes e as outras variáveis categóricas (por exemplo, pacientes versus controles, etnia, gênero, etc.) foram examinados por meio de testes estatísticos univariados e realizado a análise de tabelas de contingência com cálculo do Odds Ratio (OR) e índice de confiança de 95 % (IC). Não foi utilizado correção do valor de p porque os resultados dessas análises univariadas foram usados para delinear as variáveis explicativas relevantes que foram, posteriormente, utilizadas como variáveis explanatórias independentes com transtorno por uso de tabaco nas análises multivariadas finais. Análises de Regressão Logística Bivariada (automática ou com a entrada forçada de variáveis explicativas) foram utilizadas para definir a associação entre transtorno de uso de tabaco (o grupo nunca fumantes sendo o grupo de referência) e os genótipos polimórficos, enquanto foi realizado o ajuste para outras variáveis explicativas, incluindo a etnia, idade, sexo, anos de educação, etc. Foram utilizados para estimar Odds Ratio (OR) com IC 95% os coeficientes de regressão logística das variáveis independentes. As relações entre os genótipos polimórficos e as variáveis contínuas foram analisadas utilizando análise de variância (ANOVAs). As relações entre as variáveis contínuas de tabagismo (por exemplo, cigarros/dia, idade de início, etc.) e as variáveis explicativas (incluindo variantes de genes e fatores ambientais) foram exploradas usando o modelo de análise linear generalizado (GLM). Os dados foram expressos como média e desvio padrão (\pm DP). Testamos a normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS (versão 20). Todos os testes foram bi-caudais e um valor de $p < 0,05$ foi usado para significância estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na forma de um artigo científico, que foi submetido à publicação em um periódico indexado no Medline: “Adicction”- <http://www.addictionjournal.org>- com fator de impacto de 4.75.

4.1 ARTIGO

The glutathione S-transferases *GSTM1* and *GSTT1* genes are associated with tobacco use disorder, but not smoking cessation.

Sandra Odebrecht Vargas Nunes^{1,2}, Luiz Gustavo Piccoli de Melo², Márcia Regina Pizzo de Castro², Maria Angelica Ehara Watanabe³, Roberta Losi Guembarovski³, Michael Maes^{4,5,6*}

ABSTRACT

Background and Aims: This paper examines the relationship between tobacco use disorder and polymorphisms by deletion in genes that encode glutathione *S-transferases* (*GSTs*), such as *GSTM1* and *GSTT1*. Individuals with homozygous gene deletions show deficiencies in *GSTs* enzyme activities, which impair cellular detoxification and may increase the risk to tobacco use disorder.

Methods: This study comprised 182 tobacco users and 182 control subjects, i.e. never-smokers. A diagnosis of tobacco use disorder was made using DSM-IV criteria, never-smokers with CDC criteria and smoking cessation using exhaled carbon monoxide. *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms were assessed using a Multiplex-PCR based protocol.

Results: Logistic regression analysis showed a significant association between tobacco use disorder and the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes (both protective), while adjusting for years of education, age, gender, marital status and ethnicity. There were no significant associations between *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTT1/M1* genetic variants and high scores on the Fagerström test for nicotine dependence, age at onset of tobacco use, smoking cessation or a family history of tobacco use disorder. Patients with tobacco use disorder had

¹ Department of Clinical Medicine, Psychiatry Unit, Health Sciences Center, Londrina State University, University Hospital.

² Center of Approach and Treatment for Smokers, University Hospital, Londrina State University, University Campus.

³ Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Department of Psychiatry, Deakin University, Geelong, Australia.

⁵ Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁶ Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Brazil.

* Corresponding author: Prof.Dr.M.Maes, M.DF, Ph.D.

Center of Approach and Treatment for Smokers, University Hospital, Londrina State University, University Campus / Post Office Box 6001/ ZIP 86051-990- Londrina- Paraná- Brazil. Phone: 55-43-99223222; Fax: 55-43-33485977

E-mail: dr.michaelmaes@hotmail.com

increased rates of a family history of tobacco use disorder and prevalence of cardiovascular disease, hypertension, and lung disease as compared to control subjects. The *GSTT1* null genotype increased risk to hypertension.

Discussion: The results show that the *GSTM1* and maybe the *GSTT1* null genotype may confer protection against tobacco use disorder. We describe a new paradigm that links the peripheral effects of null and wild GSTs genotypes with the central effects of reward and other gene variants as risk factors for tobacco use disorder and smoking-related medical diseases.

Keywords: Tobacco Use disorder. Genetic polymorphism. Glutathione S-Transferase. *GSTM1*. *GSTT1*. Smoking Cessation.

1. Introduction

Tobacco use disorder leads to increased risk of mortality (79) and is one of the major risk factors for multiple chronic diseases, such as cardiovascular illness, chronic obstructive pulmonary disease and cancer (5). Medical consequences of tobacco use often begin when users are in their 40s and usually become progressively more debilitating over time. The most common psychiatric co-morbidities are alcohol and others substance use disorders (2). Genetic studies suggest that tobacco use disorder is a complex behavior that includes a number of stages of addiction, such as vulnerability to initiation, continued use, propensity to become dependent, cessation and relapse. The majority of studies on smoking behavior focused on genes in relevant neurotransmitter pathways, which modulate drug reward circuits and nicotine metabolism, and detected a degree of heritability of about 50% (8-11).

Cigarette smoke contains several thousands of compounds many of which are toxic or increase inflammatory and oxidative stress pathways. Glutathione S-transferases (GSTs) are important Phase II enzymes involved in detoxification of toxic compounds with different chemical structures found in cigarette smoke (21, 80). GSTs carry out a range of functions in cells, such as removal of the reactive oxygen species and regeneration of S-thiolated proteins, both of them being consequences of oxidative stress (42). GSTs are additionally antioxidant enzymes that protect against lipid peroxidation (41). Genetic polymorphisms by deletion in genes that encode GSTs, such as the polymorphisms in Mu (*GSTM1*) and Theta (*GSTT1*) classes, with non-functional null alleles, are associated with the absence of the corresponding enzymatic activity (21). The *GSTM1/GSTT1* null genetic polymorphisms increase the risk toward tobacco use-related disorders, such as coronary heart disease (36, 44-50, 81), lung diseases (52), cerebrovascular disease (53, 54) and cancers (56, 57). Other studies, however, were unable to detect a significant association between *GSTM1/GSTT1* null genotypes and risk of ischemic heart disease (58) and cancer (59-61). Tobacco-related diseases, such as cardiovascular disease, chronic obstructive

pulmonary disease and diabetes are associated with mood disorders, such as major depression and bipolar disorder, through shared immune-inflammatory and oxidative stress pathways (62, 63). Furthermore, GSTs genetic polymorphisms may be associated with increased oxidative stress and inflammation and therefore with tobacco-related and inflammation-related-diseases (42, 64).

The purpose of this study was to investigate the association between polymorphisms in *GSTT1* and *GSTM1* genes and the susceptibility to tobacco use disorders and smoking cessation.

2. Methods

2.1. Study sample

In this cross-sectional, case-control study, patients with current tobacco use disorder (n=182, the cases) were recruited from outpatients at the Center of Approach and Treatment for Smokers, a smoking cessation program at UEL (Londrina State University), Paraná, Brazil. One hundred and eighty two never-smokers (the control group) were recruited from staff at UEL. Never-smokers were defined by CDC criteria (US Centers For Diseases Control and Prevention) as people who had never smoked any cigarette (68). Our patients with tobacco use disorder were all current smokers who had smoked at least 100 cigarettes during their lifetime and, at the time of interview, reported smoking every day or some days (82). The study was conducted from March 2011 to July 2012. Inclusion criteria for all participants were being aged 18–65, normal cognitive function, having completed the interview and completed the genotyping.

In our patients with tobacco use disorder, treatment is usually delivered in a group of 10-15 participants. The participants first receive an individualized assessment with a physician and then attend four weekly group sessions, each lasting about 1½ hour. This is followed by two biweekly sessions and then by monthly sessions for a period of 52 weeks. Parallel to the group sessions, tobacco users also receive pharmacological intervention and monitoring through individual visits if needed. Non-pharmacological treatment comprised a program of cognitive therapy and pharmacological agents (bupropion and nicotine replacement therapy) used in accordance with the guidelines of the Ministry of Health of Brazil (65). The combined program of non-pharmacological treatment and pharmacological agents is effective for both genders (66). The Ethics Research Committee at UEL approved this project (approval number: 035/2013) and all subjects had given written informed consent to participate in the study.

2.2. Measurements

2.2.1. *Socio-demographic and clinical measurements*

Smoking status, clinical information, such as, medical history of tobacco-related diseases (obstructive pulmonary disease, coronary heart disease, cancer, hypertension and diabetes) and socio-demographic data were obtained through an interviewer-administered structured questionnaire. Body mass index (BMI) was calculated as weight (Kg) divided by square of height in meters (m²).

2.2.2. *Tobacco use disorder*

The diagnosis of tobacco use disorder was made using the Structured Clinical Interview (SCID) for DSM-IV, axis I (American Psychiatric Association, 2000) translated into Portuguese and validated(67).

2.2.3. *Fagerström test for Nicotine Dependence*

The Fagerström test for Nicotine Dependence (FTND), revised by Fagerström and Schneider (1989), was administered to all subjects with tobacco use disorder in a translated Portuguese version validated for the Brazil population (72). The FTND produces a score ranging from 0 to 10 and nicotine dependence is defined as a score > 5 (74).

2.2.4. *Lifetime cigarette consumption (pack-years)*

The pack-years were calculated by the number of cigarettes smoked per day divided by 20 and multiplied by the number of years smoked.

2.2.5. *Family history of smoking*

The family history of tobacco use disorder consisted of reports of the smoking history of first-degree family members.

2.2.6. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST)

We used the ASSIST questionnaire to screen for risk of alcohol and sedatives in adults. Patients with tobacco use disorder whose alcohol involvement scores were between 0 and 10 (low risk) and between 11 and 26 (moderate risk) were offered a brief intervention and those with scores higher than 27 (high risk) were offered an intensive treatment program. Patients with tobacco use disorder whose sedative use scores were between 0 and 3 (low risk) and those with scores between 4 and 26 (moderate risk) were offered a brief intervention, while smokers whose score was 27 or more (high risk of harm and substance dependence) were offered intensive intervention (83).

2.2.7. Smoking exhaled carbon monoxide (CO)

Smoking status and smoking cessation were 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 as more than 6ppm (smoking) and \leq 6ppm (not smoking) (77). In patients with tobacco use disorder, smoking cessation was diagnosed when CO_{EXH} concentrations 52 weeks after inclusion in the treatment programs were \leq 6ppm.

2.3. Genotyping

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. After precipitation with ethanol, the DNA pellet was re-suspended in 50 μL of Biopur Kit specific buffer, quantified by spectrophotometry, and stored at -80°C for later use in genotyping analyses. The genetic polymorphisms were detected using a multiplex PCR (polymerase chain reaction) protocol (78) with modifications: 80-100 ng of DNA were amplified in a total volume of 25 μL of reaction solution containing 20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl_2 ; 200-300 mM of each deoxynucleotide triphosphate; 10 pmol of each primer and 1.25 U of AmpliTaq DNA polymerase. PCR was carried out in a PTC-100 Thermocycler (MJ Research, Inc), after 5 minutes of pretreatment at 94°C , 30 cycles of 1 minute at 94°C , 1 minute at 59°C , and 30 seconds at 72°C , followed by 5 minutes at 72°C . The PCR products were analyzed by electrophoresis on 10% acrylamide gel and detected by a non-radioisotopes technique using a commercially available silver staining method.

The genotype was coded according to *GSTM1/GSTT1* genetic polymorphisms: 1) *GSTT1* present and *GSTM1* absent or *GSTT1* absent and *GSTM1* present (at least one gene deleted), 2) both genes present, and 3) both genes deleted. The absence of a 215 base pair (bp) fragment in the electrophoretic profile indicates the *GSTM1* null genotype and the absence of a 480bp fragment indicates the *GSTT1* null genotype. A fragment of 312bp related to a non-polymorphic fragment of the *CYP1A1* (Cytochrome P450 1A1) gene was used as an internal control in all reactions. Negative controls using ultra pure water were included in each reaction.

2.4. Statistical analyses

The associations between the wild (presence) or variant (deleted) genes and other categorical variables (e.g. patients versus controls, ethnicity, gender, etc) were examined through univariate statistical tests, e.g. analyses of contingency tables with computation of the Odds Ratio (OR) with lower and upper 95% confidence intervals (CI). Power analysis showed that using a power of 0.82 and an effect size of 0.12 the total sample size should be 360. No p-correction was employed to examine the multiple statistical analyses on socio-demographic and clinical data because the results of those univariate analyses were used to delineate the relevant explanatory variables, which were subsequently used as determinants of independent association with tobacco use disorder in the ultimate multivariate, logistic regression analyses. Bivariate logistic regression analyses (automatic or with forced entry of explanatory variables) were used to define the associations between tobacco use disorder (the never-smoking group being the reference group) and the GSTs genes, while adjusting for other explanatory variables, including ethnicity, age, gender, years of education, etc. The logistic regression coefficients of the independent variables were employed to estimate odds ratios with 95% CIs. Relationships between the GSTs genes and continuous variables were examined using analyses of variance (ANOVAs). Relationships between continuous characteristics (e.g. cigarettes/day, age at onset, etc) and explanatory variables (including genetic variants and environmental factors) were explored using generalized linear model (GLM) analyses. The data are expressed as mean \pm standard deviations (\pm SD). We tested normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test. Statistical analyses were performed using SPSS (Version 20). All tests were two-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance.

3. Results

3.1. Socio-demographic and clinical characteristics of tobacco use dependence

Table 1 shows that there were no significant associations between the tobacco use disorder and gender and ethnicity. Patients with tobacco use disorder (the cases; mean age \pm SD =48.5 \pm 10.2 years) were significantly ($F=7.3$, $df=1/362$, $p=0.007$) older than never-smokers (the controls; mean=45.9 \pm 7.8 years). Never-smokers showed more individuals with stable relationships compared to patients with tobacco use disorder. Smokers showed a significantly higher rate of a positive family history of tobacco use disorder and a significantly increased risk of alcohol and sedative use. Patients with tobacco use disorder also showed a higher prevalence of cardiovascular disease, blood hypertension and lung disease, but not diabetes and cancer. There were no significant differences in body mass index (BMI in kg/m^2) between the two groups. Cases (mean \pm SD years of education = 9.7 \pm 5.3 years) showed a significantly lower level of education ($F=135.2$, $df=1/362$, $p<0.001$) than controls (mean=16.0 \pm 4.9 years). In individuals with tobacco use disorder, the mean age at onset of tobacco use was 14.9 years (\pm 4.1), duration of tobacco use was 33.0 years (\pm 11.4), they had smoked 22.3 (\pm 13.2) cigarettes per day and 36.9 pack-years (\pm 26.8). Their mean FTND score was 5.8 (\pm 2.2) and they showed 1.7 (\pm 0.7) attempts at smoking cessation.

3.2. GSTs genetic polymorphisms and tobacco use disorder

Table 2 shows the frequencies of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in patients with tobacco use disorder versus never-smokers. There was no significant association between tobacco use disorder and *GSTT1* or the *GSTM1/GSTT1* combined genes. There was a marginal association between *GSTM1* genotype and tobacco use disorder at $p=0.050$.

Table 3 shows the results of logistic regression analyses with tobacco use disorder as dependent variable (never-smokers being the reference group) and *GSTM1* null genotypes, age, gender, years of education, ethnicity, marital status and history family of smoking as explanatory variables. We found that 3 variables were significantly associated with tobacco use disorder ($\chi^2 =146.98$, $df=9$, $p<0.001$, Nagelkerke = 0.44): the *GSTM1* null genotype and education level show protective effects, whereas a family history of tobacco use disorder is a risk factor. The other variables did not reach significance. Forced entry of the *GSTT1* null (Wald=3.60, $df=1$, $p=0.058$) and *GSTM1/T1* null (Wald=3.1, $df=1$, $p=0.051$) genotypes instead of *GSTM1* showed that there was a trend towards a significantly

association with tobacco use disorder. The interaction *GSTM1* and *GSTT1* was also not significant.

Table 4 shows the results of an automatic logistic regression analysis with tobacco use disorder as dependent variable and all variables listed in Table 3 together with *GSTT1* null genotypes and the interaction *GSTM1* X *GSTT1* as explanatory variables. We found that 5 variables significantly predicted tobacco use disorder: *GSTM1* null, *GSTT1* null, stable relationship and years of education show protective effects, while a family history of smoking increases the odds of tobacco use disorder ($\chi^2 = 146.88$, $df=5$, $p<0.001$, Nagelkerke = 0.44).

Table 5 shows the GSTs genotypes in association with the smoking characteristics in patients with tobacco use disorder. There were no significant associations between *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTM1/GSTT1* genes and the onset of tobacco use disorder, duration of illness, cigarettes/day and pack years. There was also no significant association between the genetic polymorphisms and the FTND scale, cessation of smoking after 52 weeks, or family history of smoking. GLM analyses also did not show any relationship between the continuous smoking characteristics (onset of tobacco use disorder, duration of illness, cigarettes/day and pack years, FTND scale) and the genotype polymorphisms after considering the effects of the abovementioned explanatory variables.

3.3. GSTs genotypes and medical disorders.

There was a significant association between hypertension and the *GSTT1* null genotype ($\chi^2 = 7.25$, $df=1$, $p=0.007$). Automatic regression analyses showed that three variables were significantly linked with hypertension ($\chi^2 = 50.66$, $df=3$, $p<0.001$; Nagelkerke = 0.196), i.e. *GSTT1* null genotype (Wald=5.24, $df=1$, $p=0.002$; OR=1.91, CI: 1.09-1.33), increasing age (Wald=23.87, $df=1$, $p<0.001$; OR=1.09, CI: 1.05-1.12) and years of education (Wald=6.92, $df=1$, $p=0.009$; OR=0.94, CI: 0.89-0.98). Tobacco use disorder was a significant predictor of lung disease (Wald=8.52, $df=1$, $p=0.004$; OR=2.52; CI: 1.35-4.68). We were unable to detect significant associations between the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTM1/T1* genotypes and cancer, diabetes and cardiovascular disorders.

4. Discussion

The major finding of this study is that the *GSTM1* null and maybe the *GSTT1* null genotypes have a protective effect on tobacco use disorder while there were no significant associations with the *GSTT1/GSTM1* null genotype. To the best of our knowledge this is the first study reporting on a significant association between tobacco use disorder and

the *GSTM1* null and maybe the *GSTT1* null genotype. One previous study reported on *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTT1/GSTM1* gene polymorphisms in association with tobacco use disorder using univariate statistical analyses (80). These authors were unable to detect significant associations between those gene polymorphisms and tobacco use disorder. The discrepancies between our results and the results of Saadat and Mohabatkar (2004) may be explained by differences in statistical analyses (univariate versus multivariate) and by differences in ethnicity (an Iranian versus a Brazilian population). Moreover, we specified tobacco use disorder according to DSM IV criteria and never-smokers according to CDC criteria, whereas Saadat and Mohabatkar (2004) did not use any specified instrument to diagnose their cases and controls. Finally, we recruited patients with a high Fagerstrom score indicating that we included the more severe cases, whereas Saadat and Mohabatkar (2004) did not specify severity of illness.

Logistic regression analysis showed that the *GSTM1* null and *GSTT1* null genotypes (both protective), a family history of smoking (a risk factor), marital status and years of education were the most significant independent predictors of tobacco use disorder, while gender, age and ethnicity were not significantly associated with tobacco use disorder. Thus, a positive family history of tobacco use disorder was an important risk factor independent from the effects of *GSTM1* and *GSTT1* genetic polymorphisms, while there were no significant associations between the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTM1/T1* genotypes and a history family of smoking. This suggests that other genetic variants may increase the risk of tobacco use disorder, including CYP2A6, 5-HTLPR, DRD2, STin2 VNTR and CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 genes [7]. Heritability and low educational levels are thought to be associated with tobacco use disorder and more difficulties with smoking cessation (2). It is known that genetic factors contribute to smoking behavior from initiation through to smoking quantity, nicotine dependence, and difficulty with smoking cessation (8, 9). In our study, however, there were no significant associations between *GSTT1* or *GSTM1* genotypes (alone and together) and high scores on the FTND scale, smoking cessation, a family history of smoking, age at onset of tobacco use and the number of cigarettes smoked per day or packs per year. The effects of lower education level on tobacco use disorder may in part be explained by the healthier life style of more educated people (84).

In our study, individuals with current tobacco use disorder had significantly more use of alcohol and sedatives, lung disease, cardiovascular disease and blood hypertension than never-smokers. It is known that alcohol and sedative drug dependence and mood disorders are among the most common psychiatric comorbidities in current smokers. Nicotine-dependent smokers are 2.7 to 8.1 times more likely to have psychiatric comorbidities and medical diseases than nondependent smokers, non-smokers or ex-smokers (2). It is known that one-half of patients with tobacco use disorder who do not quit

will die early from tobacco-related diseases such as cardiovascular illnesses, chronic obstructive pulmonary disease and cancers. Moreover, smokers with serious mental illness are at increased risk of cancer, lung disease, and cardiovascular disease, and they die 25 years sooner, on average, than non-smokers(68).

As reviewed previously, the latter medical disorders are accompanied by activated immune-inflammatory pathways that may be induced or maintained by tobacco smoking (63, 85). Therefore, it can be inferred that the effects of tobacco use disorder on these illnesses is caused by the cumulative effects of many toxic compounds of different chemical structures that may be found in cigarette smoke and the consequent excess of oxidative and nitrosative stress, depleted antioxidant defenses and activated immune-inflammatory pathways (63). Mechanisms leading to disorders in GSH metabolism, including *GSTM1/T1* genetic polymorphisms, may underpin the pathophysiology of tobacco use-related medical diseases through increased effects on oxidative or nitrosative pathways and the consequent damage to proteins, lipids, carbohydrates and deoxyribonucleic acid (DNA) (41). However, the results of our study show that the *GSTM1* null and *GSTT1* null genotypes, which are both associated with lowered detoxification and increased oxidative stress, decrease the risk of tobacco use disorder. Thus subjects with the null genotypes have an increased risk for these medical diseases and are at the same time protected to develop tobacco use disorder. Phrased differently, the effects of tobacco use disorder increasing the risk of these illnesses is probably not related to the known effects of the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes on the oxidative and immune pathways, but to the effects of toxic compounds, which are produced by smoking and cause activation of oxidative and immune pathways.

These apparently discrepant effects of GSTs null genotypes on tobacco use disorder and smoking-related medical disorders may be explained by a new paradigm. Until now the focus was on the brain reward circuits that determine and maintain smoking behavior, e.g. “smoking reward ('liking') and reinforcement (latency to first puff and total puffs)”, such as those mediated by dopaminergic and opioid gene variants (86). However, our study shows that also peripheral and protective effects of gene variants that determine GSH metabolism and detoxification are involved. These protective effects may be explained by the direct effects of smoking increasing xenobiotics and oxidative and inflammatory pathways due to the lack of GSTs in subjects with *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions. Thus, subjects with the null genotypes may be expected to stop their smoking behavior due to immediate unpleasant side effects of nicotine, such as nausea and dizziness, and effects of activated immune-inflammatory and oxidative stress, such as increased anxiety, distress and mood alterations (85). Indeed, it is known that increased levels of cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), IL-6 and tumor necrosis factor- α , and oxidative stress may induce depressive feelings, anxiety, distress, fatigue, etc. [31]. On the other hand, it is known that

the GSTs null genotypes are related to many medical disorders (see Introduction). For example, in our study we found a significant association between hypertension and the *GSTT1* null genotype, which is in accordance with the literature (87). These relationships can be explained by increased oxidative and nitrosative stress and activated immune-inflammatory pathways in subjects with the GSTs null genotypes (41). In individuals with the wild genotype, on the other hand, the presence of active enzymes may lower smoking-induced side effects thereby increasing the risk to develop tobacco use disorder especially when other genes are present, e.g. the smoking-reward genes and *CYP2A6* and *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* genes. Current tobacco use disorder in turn enhances the immune and oxidative stress pathophysiology of these disorders (63). In fact, these effects found in subjects with the GSTs null genotypes may be comparable to the positive selection of lactose tolerant individuals in populations (e.g. European) with high intake of dairy products and this in contrast to the high prevalence (90%) of the wild type lactose intolerance in for example Sicilian (70%) and Asian (around 90%) populations(88, 89). The lactose tolerance is explained by several mutations that evolutionary favored a continued lactase production or lactase persistence after childhood and thus lactose tolerance. While lactose tolerance may be explained by culture-gene interactions, the development of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes could maybe be explained by smoking-gene interactions that favored a positive selection of cigarette smoke-tolerant individuals who thus developed tolerance to the immediate toxic effects of cigarette smoke. All in all, we here suggest a new paradigm that links the peripheral effects of null and wild GSTs genotypes with the central effects of smoking-reward and other gene variants as risk factors of tobacco use disorder and smoking-related disorders. Figure 1 shows this new model.

We discussed already the strengths of our study, including our comprehensive diagnostic approach and clinical assessments, but there are also some potential weaknesses. Firstly, reports from “association studies constitute tentative knowledge and must be interpreted with caution” (90). Our data should be confirmed using populations with different ethnicities. Secondly, our study was a case-control study and therefore our results are indicative for a significant association and do not allow to draw conclusions on causality. Moreover, single common genes explain probably only a very small part of the outcome variation in tobacco use disorder, while it is likely that multiple common variants may underpin the disorder. Finally, many other environmental factors and biological pathways undoubtedly contribute to the development of tobacco use disorder.

In summary, our study provides evidence for a possible genetic link between tobacco use disorder and the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes. Future studies should examine multiple genetic variants (including the *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes) and genes coding for immune-inflammatory and oxidative stress molecules and brain reward

circuits which all together may be related to tobacco use disorder and tobacco-related diseases.

Acknowledgements

The authors would like to gratefully acknowledge the Health Sciences Postgraduate Program, the Genetic Laboratory and the Centre of Approach and Treatment for Smokers at UEL (Londrina State University), Brazil.

Funding

This study was supported by the Health Sciences Post graduate Program, Londrina State University (UEL), Paraná, Brazil and The Araucaria Foundation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors contributed equally to the writing up of this paper.

References

1. Ezzati M, Lopez AD (2003) Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* 362 (9387):847-852. doi:10.1016/S0140-6736(03)14338-3
2. Gellert C, Schottker B, Brenner H (2012) Smoking and all-cause mortality in older people: systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine* 172 (11):837-844. doi:10.1001/archinternmed.2012.1397
3. American Psychiatric Association (2013) Tobacco-Related Disorders of DSM-5. In: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*, vol 5th ed. pp 571-577. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.744053
4. Hall W, Madden P, Lynskey M (2002) The genetics of tobacco use: methods, findings and policy implications. *Tobacco control* 11 (2):119-124. doi:10.1136/tc.11.2.119
5. Ho MK, Tyndale RF (2007) Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. *The pharmacogenomics journal* 7 (2):81-98. doi:10.1038/sj.tpj.6500436
6. Li MD, Burmeister M (2009) New insights into the genetics of addiction. *Nature reviews Genetics* 10 (4):225-231. doi:10.1038/nrg2536
7. Belsky DW, Moffitt TE, Baker TB, Biddle AK, Evans JP, Harrington H, Houts R, Meier M, Sugden K, Williams B, Poulton R, Caspi A (2013) Polygenic risk and the developmental progression to heavy, persistent smoking and nicotine dependence: evidence

from a 4-decade longitudinal study. *JAMA psychiatry* 70 (5):534-542. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.736

8. Saadat M, Mohabatkar H (2004) Polymorphisms of glutathione S-transferases M1 and T1 do not account for interindividual differences for smoking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77 (4):793-795. doi:10.1016/j.pbb.2004.02.003

9. Hayes JD, Strange RC (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 61 (3):154-166. doi:28396

10. Zivkovic M, Stankovic A, Djuric T, Koncar I, Kolakovic A, Djurdjevic V, Davidovic L, Alavantic D (2014) Effects of glutathione S-transferase T1 and M1 deletions on advanced carotid atherosclerosis, oxidative, lipid and inflammatory parameters. *Molecular biology reports* 41 (2):1157-1164. doi:10.1007/s11033-013-2962-z

11. Morris G AG, Dean O, Berk M, Galecki P, Martin-Subero M, Maes (2014, in press) The glutathione system: a new drug target in neuro-immune disorders. *Mol Neurobiol*

12. Li R, Boerwinkle E, Olshan AF, Chambless LE, Pankow JS, Tyroler HA, Bray M, Pittman GS, Bell DA, Heiss G (2000) Glutathione S-transferase genotype as a susceptibility factor in smoking-related coronary heart disease. *Atherosclerosis* 149 (2):451-462

13. Olshan AF, Li R, Pankow JS, Bray M, Tyroler HA, Chambless LE, Boerwinkle E, Pittman GS, Bell DA (2003) Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione S-transferase genes. *Epidemiology* 14 (3):321-327

14. Masetti S, Botto N, Manfredi S, Colombo MG, Rizza A, Vassalle C, Clerico A, Biagini A, Andreassi MG (2003) Interactive effect of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on occurrence and severity of coronary artery risk. *Journal of molecular medicine* 81 (8):488-494. doi:10.1007/s00109-003-0448-5

15. Tamer L, Ercan B, Camsari A, Yildirim H, Cicek D, Sucu N, Ates NA, Atik U (2004) Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor in smoking-related coronary artery disease. *Basic research in cardiology* 99 (3):223-229. doi:10.1007/s00395-004-0465-8

16. Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mohamed GH, Dzimiri N (2006) T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *BMC medical genetics* 7:38. doi:10.1186/1471-2350-7-38

17. Manfredi S, Federici C, Picano E, Botto N, Rizza A, Andreassi MG (2007) GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: a case-only study. *Mutation research* 621 (1-2):106-112. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.02.014

18. Kim SJ, Kim MG, Kim KS, Song JS, Yim SV, Chung JH (2008) Impact of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms on the smoking-related coronary artery disease. *Journal of Korean medical science* 23 (3):365-372. doi:10.3346/jkms.2008.23.3.365

19. Wang J, Zou L, Huang S, Lu F, Lang X, Han L, Song Z, Xu Z (2010) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis* 25 (4):365-369. doi:10.1093/mutage/geq014

20. Singh N, Sinha N, Kumar S, Pandey CM, Agrawal S (2011) Glutathione S-transferase gene polymorphism as a susceptibility factor for acute myocardial infarction and smoking in the North Indian population. *Cardiology* 118 (1):16-21. doi:10.1159/000324066

21. He JQ, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ (2004) Glutathione S-transferase variants and their interaction with smoking on lung function. *American journal of respiratory and critical care medicine* 170 (4):388-394. doi:10.1164/rccm.200312-1763OC

22. Um JY, Kim HM, Han SH, Cho KH, Moon BS, Hong SH (2006) Glutathione s-transferase gene polymorphism and ischemic cerebrovascular disease. *The International journal of neuroscience* 116 (1):55-65. doi:10.1080/00207450690962398

23. Um JY, An NH, Kim SH, Lee KM, Kim YS, Jang H, Cho KH, Moon BS, Kim HM (2003) Genetic susceptibility to ischemic cerebrovascular disease in Koreans. *Journal of*

molecular neuroscience : MN 20 (1):31-38. doi:10.1385/JMN:20:1:31

24. Rebbeck TR (1997) Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 6 (9):733-743

25. Grando J, Kuasne H, Losi-Guembarovski R, Sant'Ana Rodrigues I, Matsuda H, Fuganti P, Gregório É, Júnior F, Menezes R, Freitas Rodrigues M, Syllós Cólus I (2009) Association between polymorphisms in the biometabolism genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in bladder cancer. *Clinical and experimental medicine* 9 (1):21-28. doi:10.1007/s10238-008-0015-z

26. Norskov MS, Frikke-Schmidt R, Loft S, Sillesen H, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2011) Copy number variation in glutathione S-transferases M1 and T1 and ischemic vascular disease: four studies and meta-analyses. *Circulation Cardiovascular genetics* 4 (4):418-428. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.959809

27. Torresan C, Oliveira MM, Torrezan GT, de Oliveira SF, Abuazar CS, Losi-Guembarovski R, Lima RS, Urban CA, Cavalli IJ, Ribeiro EM (2008) Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clinical and experimental medicine* 8 (2):65-71. doi:10.1007/s10238-008-0159-x

28. Losi-Guembarovski R, Colus IM, De Menezes RP, Poliselí F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, Guembarovski AL, Oliveira BW, Ramos G, Cavalcanti TC, Mizuno LT, Cavalli IJ, Ribeiro EM (2008) Lack of association among polymorphic xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes and the occurrence and progression of oral carcinoma in a Brazilian population. *Anticancer research* 28 (2A):1023-1028

29. Rodrigues IS, Kuasne H, Losi-Guembarovski R, Fuganti PE, Gregorio EP, Kishima MO, Ito K, de Freitas Rodrigues MA, de Syllós Colus IM (2011) Evaluation of the influence of polymorphic variants CYP1A1 2B, CYP1B1 2, CYP3A4 1B, GSTM1 0, and GSTT1 0 in prostate cancer. *Urologic oncology* 29 (6):654-663. doi:10.1016/j.urolonc.2010.01.009

30. Nunes SO, Vargas HO, Prado E, Barbosa DS, de Melo LP, Moylan S, Dodd S, Berk M (2013) The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 37 (8):1336-1345. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.014

31. 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. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36 (2):764-785. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.12.005

32. Kim JH, Park SG, Lee KH, Choi JH, Ha EH, Myung SK, Hong YC (2006) GSTM1 and GSTP1 polymorphisms as potential factors for modifying the effect of smoking on inflammatory response. *Journal of Korean medical science* 21 (6):1021-1027

33. US Centers Of Disease Control and Prevention (2010) Health behaviors of adults:United States, 2005-2007. *Vital and Health Statistics* 245 (Appendix II):80

34. US Centers Of Disease Control and Prevention (2011) Quitting smoking among adults:United States, 2001-2010. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 60(44):1513-1519

35. Ministério da Saúde (2004) Plano de Implantação da Abordagem e Tratamento do Tabagismo na Rede SUS Portaria GM/MS 1.035/04Portaria SAS/MS 442/04 http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/plano_abordagem_sus.pdf

36. Odebrecht Vargas Nunes S, Pizzo de Castro MR, Odebrecht Vargas H, Mendonça Vargas M, Bueno Rezende Machado RC, Batista Fonseca IC, Dodd S, Berk M (2013) Clinical Characteristics and Smoking Cessation: An Analysis of Sex and Depressive Disorders Differences. *Addictive disorders & their treatment* 12 (3):158-165 110.1097/ADT.1090b1013e31827a31863ff

37. Del-Ben CM, Vilela JAA, Crippa JAdS, Hallak JEC, Labate CM, Zuardi AW (2001) Confiabilidade da "Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV - Versão Clínica" traduzida para o português. *Revista brasileira de psiquiatria* 23:156-159
38. Carmo JTd, Pueyo AA (2002) A adaptação ao português do Fagerström test for nicotine dependence (FTND) para avaliar a dependência e tolerância à nicotina em fumantes brasileiros. *RBM rev bras med* 59 (1/2):73-80
39. Storr CL, Reboussin BA, Anthony JC (2005) The Fagerstrom test for nicotine dependence: a comparison of standard scoring and latent class analysis approaches. *Drug and alcohol dependence* 80 (2):241-250. doi:10.1016/j.drugalcdep.2004.04.021
40. WHO AWG (2002) The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addiction* 97 ((9)):1183-1194
41. Middleton ET, Morice AH (2000) Breath carbon monoxide as an indication of smoking habit. *Chest* 117 (3):758-763
42. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer letters* 107 (2):229-233. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835\(96\)04832-X](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3835(96)04832-X)
43. Pampel FC, Krueger PM, Denney JT (2010) Socioeconomic Disparities in Health Behaviors. *Annual review of sociology* 36:349-370. doi:10.1146/annurev.soc.012809.102529
44. Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J (2011) Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro endocrinology letters* 32 (1):7-24
45. Perkins KA, Lerman C, Grotenthaler A, Ciccocioppo MM, Milanak M, Conklin CA, Bergen AW, Benowitz NL (2008) Dopamine and opioid gene variants are associated with increased smoking reward and reinforcement owing to negative mood. *Behavioural pharmacology* 19 (5-6):641-649. doi:10.1097/FBP.0b013e32830c367c
46. Petrovic D, Peterlin B (2014) GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. *Clinical biochemistry*. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.03.012
47. Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM (2009) Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human genetics* 124 (6):579-591. doi:10.1007/s00439-008-0593-6
48. Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, Chamberlain AT, Nunes TP, Metodiev S, Ferrand N, Erhardt G (2003) Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature genetics* 35 (4):311-313. doi:10.1038/ng1263
49. Sullivan PF (2007) Spurious genetic associations. *Biological psychiatry* 61 (10):1121-1126. doi:10.1016/j.biopsych.2006.11.010

Table 1: Socio-demographic and clinical characteristics of patients with tobacco use disorder and never-smokers.

Clinical and Demographic Characteristics	Tobacco use Disorder		Never-Smokers		p-value
	n	%	n	%	
<i>Gender</i>					0.319
Male	66	(36.3)	57	(31.3)	
Female	116	(63.7)	125	(68.7)	
<i>Marital Status</i>					0.028*
Stable relationship	109	(59.8)	129	(70.8)	
Other (Single /Divorced/Separated)	73	(40.2)	53	(29.2)	
<i>Ethnicity</i>					0.182
Caucasian	127	(69.8)	127	(69.8)	
African	18	(9.9)	17	(9.3)	
Asian	4	(2.2)	12	(6.6)	
Mixed	33	(18.1)	26	(14.3)	
Family history of smoking	157	(86.3)	135	(74.2)	0.004*
Alcohol (ASSIST) ¹					0.000*
Low risk	23	(12.6)	0	(0)	
Moderate risk	6	(3.3)	0	(0)	
Sedative (ASSIST) ¹					0.000*
Low risk	13	(7.2)	0	(0)	
Moderate risk	0	(0)	0	(0)	
Diabetes	13	(7.5)	9	(5.0)	0.329
Cardiovascular diseases	25	(14.4)	13	(7.2)	0.029*
Blood hypertension	55	(31.6)	36	(19.9)	0.011*
Lung diseases	36	(20.7)	17	(9.4)	0.003*
Cancer	9	(5.2)	4	(2.2)	0.137
BMI >30 ²	41	(22.5)	30	(16.5)	0.146

The association between the socio-demographic and clinical characteristics and the two groups is based on Pearson Chi-square test.

* Indicates statistically significant difference at p<0.05.

¹ There were no 'high risk' participants; ² BMI - Body Mass Index (kg/m²)

Table 2: *GSTM1/GSTT1* genetic polymorphisms assessments in patients with tobacco use disorder and never-smokers

Characteristics	Tobacco use disorder (n=182)		Never-smokers (n=182)		p-value ¹	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
<i>Genotypes</i>						
<i>GSTT1/GSTM1</i> genes						
Positive	160	87.9	152	83.5		
Null genotypes	22	12.1	30	16.5	0.23	0.70 (0.38-1.26)
<i>GSTT1</i> gene						
Positive	140	76.9	130	71.4		
Null genotype	42	23.1	52	28.6	0.23	0.86 (0.66-1.10)
<i>GSTM1</i> gene						
Positive	75	41.2	57	31.3		
Null genotype	107	58.8	125	68.7	0.05	0.65 (0.42-1.00)

GSTM1- glutathione S-transferases M1 gene; *GSTT1*- glutathione S-transferases T1 gene.

All results of Pearson Chi-square test for categorical variables

* indicates statistically significant association at p<0.05

Table 3: Logistic regression analysis of tobacco use disorder as dependent variable (never-smokers as reference group)

Logistic Regression Analysis	Wald	df	p-value	OR	CI (95%)	
					Lower	Upper
<i>GSTM1</i> null	7.32	1	0.007	0.469	0.271	0.812
Years of education	69.9	1	<0.001	0.746	0.69	0.79
Ethnicity	1.75	1	0.185	1.634	0.79	3.37
Marital status	7.35	1	0.087	0.471	0.27	0.81
Age	0.20	1	0.651	1.007	0.97	1.03
Gender	0.69	1	0.404	1.262	0.73	2.18
Family history of smoking	4.30	1	0.038	1.989	1.03	3.81

OR: odds ratio; CI: 95% confidence intervals; df: degrees of freedom.

Table 4: Automatic logistic regression analysis of tobacco use disorder as dependent variable (and never-smokers as reference group)

Automatic logistic regression	Wald	df	p-value	OR	CI (95%)	
					Lower	Upper
<i>GSTM1</i> null	7.48	1	0.006	0.47	0.27	0.81
<i>GSTT1</i> null	4.61	1	0.032	0.52	0.28	0.94
Years of education	73.7	1	<0.001	0.75	0.69	0.79
Marital status	6.40	1	0.011	0.50	0.29	0.85
Family history of smoking	4.60	1	0.032	2.02	1.06	3.82

OR: odds ratio; CI: confidence interval; and df: degrees of freedom.

Table 5: Associations between *GSTM1/GSTT1* genetic polymorphisms and smoking characteristics in patients with tobacco use disorder.

Smoking characteristics	<i>GSTT1/GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>
	p value	p value	p value
Age at onset of tobacco use*	0.87	0.65	0.98
Years of smoking*	0.21	0.60	0.37
Cigarettes/day*	0.38	0.80	0.32
Pack/Years*	0.91	0.88	0.72
Fagerström score	<6	0.90	0.35
	>6		
Ceased Smoking (week 52)	Yes	0.19	0.16
	No		
Family history of smoking	Yes	0.49	0.69
	No		

GSTM1: glutathione S-transferase M1 gene; *GSTT1*: glutathione S-transferase T1 gene.
The p-values are based on the Pearson Chi-square test for categorical variables or *on analyses of variance.

Figure 1 - New Tobacco Use Disorder Paradigm

TUD: Tobacco Use Disorder;

O&NS: Oxidative and Nitrosative Stress;

GSTM1: Glutathione S-Transferase M1 gene;

GSTT1: Glutathione S-Transferase T1 gene.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo na população brasileira que avaliou a possível associação entre os genes *GSTM1* e *GSTT1* em relação ao transtorno por uso do tabaco e cessação do tabagismo, após um ano de tratamento.

A principal conclusão deste estudo é que a análise de regressão logística, após ajuste para idade, sexo, estado conjugal, anos de educação, etnia e história familiar de tabagismo, indicou uma associação significativa (efeito protetor) entre o transtorno por uso de tabaco e o polimorfismo do gene *GSTM1* e, possivelmente, o polimorfismo do gene *GSTT1*.

Os genes *GSTT1/GSTM1* não se mostraram positivamente associados ao transtorno por uso do tabaco ou a cessação do tabagismo, quando analisados de forma combinada.

Também não foi observada associação entre a cessação do tabagismo após 52 semanas de iniciar um programa de tratamento intensivo e os genótipos nulos das *GSTs* avaliados. Adicionalmente, não foram observadas associações significativas entre pelo menos um ou ambos os polimorfismos quando analisados em relação aos parâmetros: altos escores na escala FTND (maior que 6), início do uso do tabaco e número de cigarros fumados por dia.

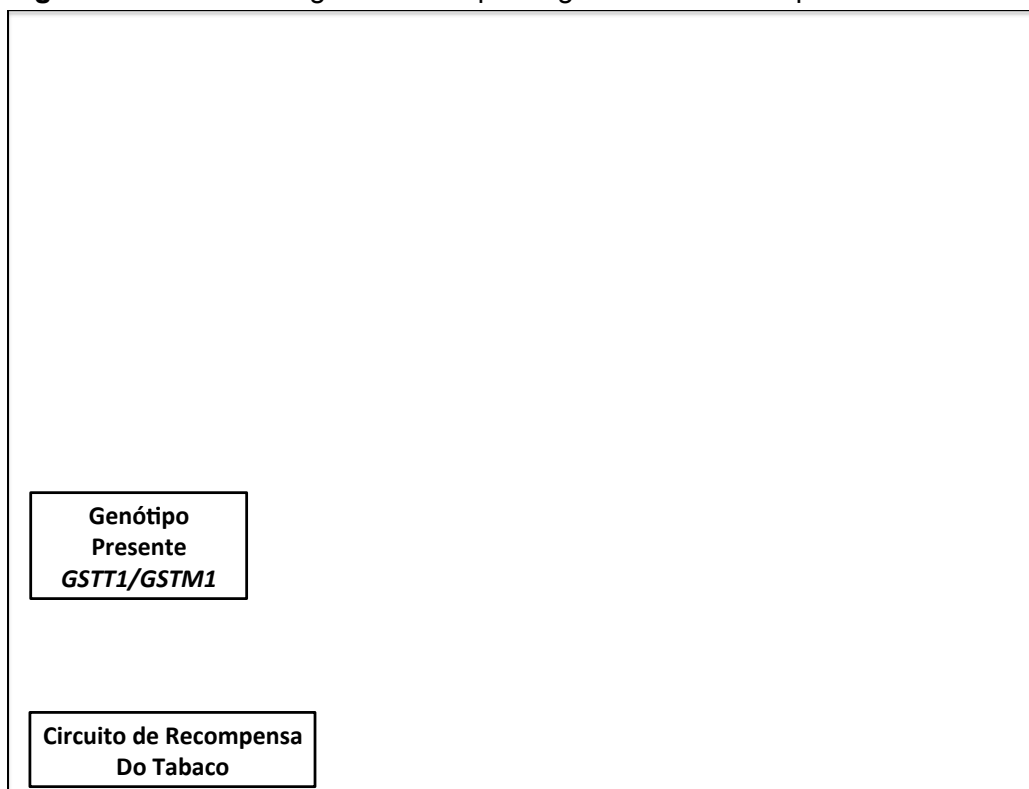
Neste estudo, os indivíduos com transtornos por uso de tabaco tiveram significativamente maior pontuação na escala FTND, anos-maço fumados com média de 36 anos, aumento nas doenças pulmonares, uso de álcool e sedativos, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, e histórico familiar de tabagismo, do que os que nunca fumaram.

Adicionalmente, foi verificada uma associação significativa entre a hipertensão arterial e o genótipo nulo do gene *GSTT1*.

Portanto, os resultados do presente estudo mostram que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* diminuem o risco de desenvolver o transtorno por uso do tabaco.

Porém, se esses indivíduos com genótipo nulo permanecerem fumando, terão risco aumentado para desenvolver as doenças relacionadas com o transtorno por uso do tabaco.

Dentro deste contexto, tais efeitos aparentemente discrepantes dos genótipos nulos das *GSTs* sobre o transtorno do uso do tabaco e os problemas de saúde relacionados com o tabagismo podem ser explicados por um novo paradigma que liga os efeitos periféricos dos genótipos das *GSTs* com os efeitos centrais de variantes genéticas dos circuitos de recompensa com transtorno do uso do tabaco e relacionam os mesmos com os efeitos fisiopatológicos do tabagismo sobre algumas doenças relacionadas ao tabaco figura 1.

Figura 1 - Novo Paradigma da Fisiopatologia do Transtorno por Uso do Tabaco

TUT : Transtorno por Uso do Tabaco

Alguns aspectos são relevantes de serem levantados e podem ter influenciado os resultados obtidos no presente trabalho.

Nosso estudo refere-se a um estudo de associação do tipo de caso-controle e, portanto, os resultados obtidos podem examinar apenas associações, e não causalidade. Os nunca fumantes apresentaram significativamente mais anos de escolaridade do que os usuários de tabaco, e sabe-se que aqueles com menor escolaridade são mais propensos a iniciar o uso do tabaco e menos propensos a parar de fumar(2).

Finalmente, muitos fatores contribuem para o desenvolvimento do transtorno de uso do tabaco, incluindo fatores hereditários e ambientais. Nem todos esses fatores são conhecidos, muito menos estudados.

Apesar dessas limitações, o presente estudo fornece evidências de uma possível associação entre o polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com o transtorno por uso do tabaco. Estudos futuros são de grande relevância científica visando elucidar o envolvimento destas mutações no contexto da suscetibilidade a doenças relacionadas ao tabaco, além de identificar possíveis associações entre os polimorfismos das GSTs e marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

6.2 ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (a) Senhor (a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa chamado “Análise polimorfismo da glutatona *GSTM1* e *GSTT1* em cessação do tabagismo”, cujos pesquisadores responsáveis são: Profa. Dra Sandra Odebrecht Vargas Nunes, do Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Londrina, e o mestrando Luiz Gustavo Piccoli de Melo. O estudo identificará se opolimorfismo genético nas glutatona estão implicadosno hábito de fumar. A realização da pesquisa será na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Justificativa: O conhecimento destes marcadores pode contribuir para identificação precoce e intensificar os tratamentos nessa população para prevenir o tabagismo.

Objetivo: Comparar os polimorfismos genéticos das glutatona *GSTM1* e *GSTT1* entre fumantes e nunca fumantes.

Procedimentos: O estudo implica em: 1) responder um questionário com dados sócio-demográficos, história clínica e tabagística; 2) responder as escalas de triagem do envolvimento com álcool, cigarro e outras substâncias (ASSIST), da OMS e uma Entrevista Clínica e Estruturada para Transtornos Mentais do Eixo 1;

Custos: A pesquisa é gratuita e, portanto, não envolve qualquer custo para os participantes, não haverá qualquer gratificação financeira pela participação.

Riscos: Nenhum dos procedimentos utilizados constitui risco direto para a integridade física ou moral dos participantes. Além disso, os participantes poderão abandonar o estudo em qualquer momento que se achar conveniente, sem qualquer prejuízo em nenhum sentido, além da garantia de permanência no tratamento de cessão de tabagismo AHC/UEL se assim for o seu desejo.

Sigilo: Embora os resultados da pesquisa possam ser divulgados em publicações e eventos científicos, a identidade dos participantes será sempre preservada de maneira

sigilosa, ou seja, em segredo.

Caso o Sr. (a) aceite o convite e concorde voluntariamente em participar do estudo assinando este termo de consentimento, consideramos que o Sr. (a) acredita que foi suficientemente informado(a) pelo(a) pesquisador(a) _____ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos nela, assim como os possíveis riscos e benefícios dessa participação.

Ressaltamos novamente que o Sr.(a) pode retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer prejuízo em nenhum sentido.

Londrina, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante: _____

Assinatura do Responsável: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Colocamo-nos à disposição para qualquer esclarecimento que se fizer necessário nos telefones (43) 33715791, (43) 33712234 ou pessoalmente no Ambulatório do Hospital de Clínica, da Universidade Estadual de Londrina (AHC/UEL), Rodovia Celso Garcia Cid Br 445, Campus Universitário, Km380. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética do estudo, entre em contato com o comitê de ética em pesquisa (CEP) da UEL/Hospital Universitário através do telefone (43)33712490.

Atenciosamente,

Profa. Sandra Odebrecht Vargas Nunes

Coordenadora do Projeto

6.3 ANEXO 2:QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO
AMBULATÓRIO 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**11. LOCAL DE TRABALHO:** _____

ENDEREÇO: _____

MUNICÍPIO: _____ CEP _____ ESTADO: _____

12. FORMAÇÃO: _____**13. PROFISSÃO:** _____**14. OCUPAÇÃO:** _____**15. RELAÇÃO COM O TRABALHO:**1. FORMAL 2. INFORMAL 3. AUTÔNOMO 4. SERVIDOR PÚBLICO **16. SITUAÇÃO TRABALHISTA:**1. DESEMPREGADO 2. AUXÍLIO-DESEMPREGO 3. ATIVIDADE NÃO REMUNERADA 4. ATIVIDADE REMUNERADA 5. AUXÍLIO-DOENÇA 6. ESTUDANTE 7. APOSENTADO 8. OUTRO _____ **17. POSSUI DOENÇA QUE O AFASTE DO TRABALHO:** 1. SIM 2. NÃO **18. QUAL É A DOENÇA?** _____ **19. ESTA DOENÇA TORNA-O INCAPAZ PARA O TRABALHO?** 1. SIM 2. NÃO **20. NO ÚLTIMO MÊS, QUANTOS DIAS FICOU AFASTADO DAS SUAS ATIVIDADES LABORAIS?** **21. QUAL FOI O MOTIVO/DOENÇA?** _____**22. NO ÚLTIMO ANO, QUANTOS DIAS FICOU AFASTADO DAS SUAS ATIVIDADES LABORAIS?** **23. QUAL FOI O MOTIVO/DOENÇA?** _____**24. ESTA DOENÇA O INCAPACITOU PARA AS ATIVIDADES DOMÉSTICAS?**1. SIM 2. NÃO **25. TEVE ALGUMA INTERNAÇÃO GERAL RECENTE:** 1. SIM 2. NÃO **26. POR QUANTAS VEZES FOI INTERNADO?** **27. QUANTOS DIAS DURARAM CADA INTERNAÇÃO?** **III – DADOS DE ENCAMINHAMENTO****28. A PROCURA DEU-SE:** 1. VOLUNTARIAMENTE 2. POR ENCAMINHAMENTO MÉDICO OU CLÍNICA 3. SUGESTÃO FAMILIAR 4. SUGESTÃO AMIGO5. SUGESTÃO COLEGA DE TRABALHO 6. OUTRO _____

IV – ABORDAGEM E TRATAMENTO DO TABAGISTA

HISTÓRIA PREGRESSA DA DOENÇA

- 29. VOCÊ TEM OU TEVE FREQUENTEMENTE AFTAS, LESÕES (FERIDAS) E/OU SANGRAMENTO NA BOCA?** 1. SIM
2. NÃO
- 29.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 30. VOCÊ TEM DIABETES MELLITUS?** 1. SIM 2. NÃO
- 30.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 31. VOCÊ TEM HIPERTENSÃO ARTERIAL?** 1. SIM 2. NÃO
- 31.2 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 32. VOCÊ TEM OU TEVE ALGUM PROBLEMA CARDÍACO?** 1. SIM 2. NÃO
- 32.1 QUAL? _____
- 32.2 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 33. VOCÊ TEM OU TEVE FREQUENTEMENTE QUEIMAÇÃO, AZIA, DOR NO ESTÔMAGO, ÚLCERA OU GASTRITE?**
1. SIM 2. NÃO
- 33.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 34. VOCÊ TEM OU TEVE ALGUM PROBLEMA PULMONAR?** 1. SIM 2. NÃO
- 34.1 QUAL? _____
- 34.2 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 35. VOCÊ TEM ALERGIA RESPIRATÓRIA?** 1. SIM 2. NÃO
- 35.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 36. VOCÊ TEM ALERGIA CUTÂNEA?** 1. SIM 2. NÃO
- 36.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 37. VOCÊ TEM OU TEVE ALGUMA LESÃO OU TUMOR MALIGNO?**
1. SIM 2. NÃO
- 37.1 ONDE (LOCAL)? _____
- 37.2 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 38. VOCÊ TEM OU TEVE CRISE CONVULSIVA, CONVULSÃO FEBRIL NA INFÂNCIA OU EPILEPSIA?**
1. SIM 2. NÃO
- 38.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 39. VOCÊ TEM ANOREXIA NERVOSA OU BULIMIA?** 1. SIM 2. NÃO
- 39.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 40. VOCÊ COSTUMA TER CRISES DE DEPRESSÃO OU ANSIEDADE?**
1. SIM 2. NÃO
- 40.1 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO
- 41. VOCÊ FAZ OU FEZ ALGUM TRATAMENTO PSICOLÓGICO OU PSIQUIÁTRICO?** 1. SIM 2. NÃO

41.1. ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO

41.2. QUAL A MEDICAÇÃO? _____

42. VOCÊ JÁ TENTOU SUICÍDIO? 1. SIM 2. NÃO

42.1 QUANTAS VEZES?

42.2 MÉTODOS DE TENTATIVA DE SUICÍDIO

1. INGESTÃO DE MEDICAMENTO 2. ARMA DE FOGO

3. INGESTÃO DE ORGANOFOSFORADO 4. GÁS

5. ENFORCAMENTO 6. PRECIPITAR-SE DE ALTURAS

7. ARMA BRANCA 8. PRECIPITAR-SE DE CARRO EM MOVIMENTO

9. OUTROS _____

43. JÁ FEZ USO DE ALGUMA MEDICAÇÃO, MESMO QUE NÃO PRESCRITA POR MÉDICO, PARA DORMIR OU SE ACALMAR? 1. SIM 2. NÃO

43.1 QUAL? _____

44. 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

45. VOCÊ TEM OU TEVE ALGUM OUTRO PROBLEMA SÉRIO DE SAÚDE QUE NÃO FOI CITADO? 1. SIM 2. NÃO

45.1 QUAL? _____

45.2 ESTÁ EM TRATAMENTO? 1. SIM 2. NÃO

45.3. QUAL? _____

46. ALGUM MEDICAMENTO EM USO ATUAL? 1. SIM 2. NÃO

46.1 QUAL? _____

AS PERGUNTAS 47 E 48 DEVERÃO SER RESPONDIDAS POR TODOS OS PACIENTES DO SEXO FEMININO. SE NÃO

IR PARA A QUESTÃO 49.

47. ESTÁ GRÁVIDA? 1. SIM 2. NÃO

47.1 QUANTOS MESES? _____

47.2 NÚMERO GESTAÇÕES _____

48. ESTÁ AMAMENTANDO? 1. SIM 2. NÃO

HISTÓRIA TABAGÍSTICA**49. COM QUANTOS ANOS VOCÊ COMEÇOU A FUMAR ?**

49.1 QUANTOS ANOS FUMA:

49.2 QUANTOS CIGARROS FUMA POR DIA:

49.3 ANOS/MAÇO (Nº CIGARROS X ANOS FUMANDO/20)

50. 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 54)

51. 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

52. QUAIS FORAM OS MOTIVOS QUE LEVARAM VOCÊ A VOLTAR A FUMAR? (MÚLTIPLA ESCOLHA) BEBIDA ESTRESSOR DE PERDA BRIGA – RAIVA FESTA SÃO GRIA JÊNICA CON ONAMENTO DO GANHAR PESO SIEDADE MOTIVO APARENTE RO**53. 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 _____

54. VOCÊ PARTICIPOU DE ALGUM GRUPO DE APOIO PARA ABORDAGEM E TRATAMENTO DO TABAGISMO EM ALGUM LUGAR? 1. SIM 2. NÃO**55. FEZ USO DE TRATAMENTO PARA PARAR DE FUMAR (PODE ESCOLHER VÁRIAS) :**BUPROPIONA REPOSIÇÃO COM ADESIVO GOMA ACUPUNTURA HOMEOPATIA GRUPO TERAPÊUTICO APOIO DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE OUTROS MEDICAMENTOS AL? _____**56. A ÚLTIMA VEZ QUE FICOU ABSTINENTE FOI POR QUANTO TEMPO (EM MESES)**

--	--

57. 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

58. VOCÊ CONVIVE COM FUMANTES NA SUA CASA? 1. SIM 2. NÃO

58.1 QUAL O GRAU DE PARENTESCO? _____

59. VOCÊ SE PREOCUPA EM GANHAR PESO AO DEIXAR DE FUMAR?

1. SIM 2. NÃO

ESCALA DE TOLERÂNCIA DE FAGERSTRÖM – GRAVIDADE À DEPENDÊNCIA DE NICOTINA

60. 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

61. VOCÊ ACHA DIFÍCIL NÃO FUMAR EM LUGARES ONDE É PROIBIDO, COMO EM IGREJAS, BIBLIOTECAS, LOCAL DE TRABALHO, SHOPPING, ETC? 1. SIM 0. NÃO

62. QUAL O CIGARRO DO DIA TRAZ MAIS SATISFAÇÃO?

1. O PRIMEIRO DA MANHÃ 0. OUTROS

63. QUANTOS CIGARROS VOCÊ FUMA POR DIA?

0. MENOS DE 10 1. DE 11 A 20 2. DE 21 A 30 3. MAIS DE 31

64. VOCÊ FUMA MAIS PELA MANHÃ? 1. SIM 2. NÃO

65. VOCÊ FUMA MESMO DOENTE QUANDO PRECISA FICAR NA CAMA A MAIOR PARTE DO TEMPO? 1. SIM

0. NÃO

66. PONTUAÇÃO

HISTÓRIA FAMILIAR DE TABAGISMO EM PRIMEIRO GRAU

67. SEU PAI FUMA OU JÁ FUMOU? 1. SIM 2. NÃO

68. SUA MÃE FUMA OU JÁ FUMOU? 1. SIM 2. NÃO

69. NÚMERO DE IRMÃOS? _____ **70. QUANTOS IRMÃOS FUMAM?**

71. NÚMERO DE FILHOS? _____ **72. QUANTOS FILHOS FUMAM?**

73. HISTÓRIA FAMILIAR: 1. POSITIVA 2. NEGATIVA 3. DESCONHECE

74. HISTÓRIA FAMILIAR DE TRANSTORNO MENTAL: 1. SIM 2. NÃO

74.1 QUAL FAMILIAR? _____

74.2 QUAL TRANSTORNO MENTAL? _____

EXAME FÍSICO – FASE 0

75. ALTURA DO PACIENTE: M 76. PESO (K): K G77. IMC – ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (PESO/ ALTURA²):78. PA: x 79. FC:

80. CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL:

81. CIRCUNFERÊNCIA QUADRIL:

82. GLICEMIA:

83. COLESTEROL TOTAL:

83.1 COLESTEROL HDL:

83.2 COLESTEROL LDL:

83.3 TRIGLICERÍDEOS:

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

ASSIST 84. NA SUA VIDA QUAL DESSAS SUBSTÂNCIAS VOCÊ JÁ USOU (SOMENTE USO NÃO MÉDICO)

	NAO	SIM
84.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	3
84.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (CERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	3
84.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	3
84.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	3
84.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	3
84.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER...)	0	3
84.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	3
84.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	3
84.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	3
84.10. 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 92.SE SIM PARA ALGUMA DROGA, PROSSIGA PARA A QUESTÃO 85 PARA CADA DROGA USADA.

85. 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
85.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	2	3	4	6
85.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (ERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	2	3	4	6
85.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	2	3	4	6
85.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	2	3	4	6
85.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	2	3	4	6
85.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER ...)	0	2	3	4	6
85.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	2	3	4	6
85.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	2	3	4	6
85.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	2	3	4	6
85.10. OUTRAS, ESPECIFICA _____	0	2	3	4	6

SE NUNCA EM TODOS OS ITENS DA QUESTÃO 85, VÁ PARA A QUESTÃO 92.

SE SIM PARA ALGUNS DESTES ITENS PROSSIGA RESPONDENDO AS QUESTÕES 86 A 91.

86. 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
86.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	3	4	5	6
86.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (ERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	3	4	5	6
86.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	3	4	5	6
86.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	3	4	5	6
86.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	3	4	5	6
86.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER...)	0	3	4	5	6
86.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	3	4	5	6
86.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	3	4	5	6
86.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	3	4	5	6
86.10. OUTRAS, ESPECIFICA _____	0	3	4	5	6

87. 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
87.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	4	5	6	7
87.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (CERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	4	5	6	7
87.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	4	5	6	7
87.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	4	5	6	7
87.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	4	5	6	7
87.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER ..)	0	4	5	6	7
87.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	4	5	6	7
87.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	4	5	6	7
87.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	4	5	6	7
87.10. OUTRAS, ESPECIFICA	0	4	5	6	7

88. (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
88.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	5	6	7	8
88.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (CERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	5	6	7	8
88.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	5	6	7	8
88.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	5	6	7	8
88.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	5	6	7	8
88.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER...)	0	5	6	7	8
88.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	5	6	7	8
88.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	5	6	7	8
88.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	5	6	7	8
88.10. OUTRAS, ESPECIFICA	0	5	6	7	8

89. 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
89.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	3	6
89.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (CERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	3	6
89.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	3	6
89.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	3	6
89.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	3	6
89.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER ...)	0	3	6
89.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	3	6
89.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	3	6
89.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	3	6
89.10. OUTRAS, ESPECIFICA	0	3	6

90. 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
90.1. DERIVADOS DO TABACO (CIGARRO, CHARUTO, CACHIMBO, FUMO DE CORDA ...)	0	3	6
90.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS (CERVEJA, VINHO, DESTILADOS – PINGA, UÍSQUE ...)	0	3	6
90.3. MACONHA (BASEADO, ERVA, HAXIXE ...)	0	3	6
90.4. COCAÍNA, CRACK (PÓ, PEDRA, BRANQUINHA, NUVEM ...)	0	3	6
90.5. ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY (BOLINHAS, REBITES ...)	0	3	6
90.6. INALANTES (COLA DE SAPATEIRO, CHEIRINHO-DA-LOLÓ, TINTA, GASOLINA, ÉTER ...)	0	3	6
90.7. HIPNÓTICOS E SEDATIVOS (REMÉDIOS PARA DORMIR, DIAZEPAN, LORAX ...)	0	3	6
90.8. DROGAS ALUCINÓGENAS (COMO LSD, ÁCIDO, CHÁ-DE-LÍRIO, COGUMELOS...)	0	3	6
90.9. OPIÓIDES (HEROÍNA, MORFINA, METADONA, COLDEÍNA ...)	0	3	6
90.10. OUTRAS, ESPECIFICA	0	3	6

91. 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

92. PONTUAÇÃO

92.1 PONTUAÇÃO – HAMILTON

92.2 PONTUAÇÃO - TABACO 1. 0-3 2. 4-26 3. 27 OU MAIS

92.3 PONTUAÇÃO-BEBIDAS ALCOÓLICAS 1. 0-10 2. 11-26 3. 27 OU MAIS

92.4 PONTUAÇÃO - MACONHA 1. 0-3 2. 4-26 3. 27 OU MAIS

92.5 PONTUAÇÃO – COCAÍNA, CRACK 1. 0-3 2. 4-26 3. 27 OU MAIS

92.6 PONTUAÇÃO – ESTIMULANTES COMO ANFETAMINAS OU ECSTASY

1. 0-3 2. 4-26 3. 27 OU MAIS

92.7 Pontuação - Inalantes 1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais

92.8 Pontuação – Hipnóticos e sedativos

1. 0-3 2. 4-26 3. 27 OU MAIS

92.9 Pontuação – Drogas alucinógenas

1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais

92.10 Pontuação – Opióides 1. 0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais

92.11 Pontuação – Outras 1.0-3 2. 4-26 3. 27 ou mais

93. SESSÕES TERAPÊUTICAS

93.1 SITUAÇÃO PACIENTE

1. FUMANTE 2. NÃO FUMANTE 3. NÃO COMPARECEU
4. LAPSO RECAÍDA 5. LAPSO ABSTINÊNCIA 6. ABANDONO

93.2 TRATAMENTO

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

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

	SIT. PAC.	TRATAM	CO EXAL-%PPM		SIT. PAC.	TRATAM	CO EXAL-%PPM
AVALIAÇÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	9ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
1ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	10ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	11ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	12ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
4ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	13ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	14ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	15ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	16ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
8ª	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	17ª SESSÃO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

SESSÃO				o			
--------	--	--	--	---	--	--	--

94.DOSAGEM IL-6 –FASE 0:

95.DOSAGEM DA PCR -FASE 0:

--	--	--

96.HTT – POLIMORFISMO– FASE 0:

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

--

96.1 GLUTATIONA

GMT1

GMM1

97.TNF A –FASE 0:

98.IL- 1 -FASE 0:

99.IL- 4 -FASE 0:

100.IL- 10 -FASE 0:

101.POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO – (TRAP) - FASE 0:

102.DIALDEÍDO MALÔNICO (MDA) - FASE 0:

103. ÓXIDO NÍTRICO (NO) - FASE 0:

104. HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (FOX) - FASE 0:

105. PRODUTOS AVANÇADOS DE PROTEÍNAS

OXIDADAS (AOPP) FASE 0:

106. Hb A1c - FASE 0:

107. A1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA - FASE 0:

108. INSULINA - FASE 0:

109. GAMA GT - FASE 0:

110. ÁCIDO ÚRICO - FASE 0:

111. FIBRINOGÊNIO - FASE 0:

112. HOMOCISTEÍNA – FASE 0:

113. ELETROFORESE PROTEÍNA – FASE 0:G/DL

%

114.HEMOGRAMA ANEMIA –FASE 0: 1- NORMAL 2- ALTERADO

115.HEMOGRAMA INFECÇÃO –FASE 0:1- NORMAL 2- ALTERADO

116.VHS - FASE 0:

117. HEPATITE B –FASE 0: 1- REAGENTE 2- NÃO REAGENTE

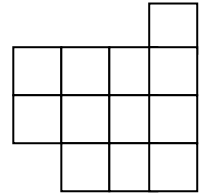
118. HEPATITE C – FASE 0: 1- REAGENTE 2- NÃO REAGENTE

119. HIV – FASE 0: 1- REAGENTE 2- NÃO REAGENTE

120. TGO – FASE 0:

121. TGP – FASE 0:

122. CREATININA – FASE 0:



7 LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 2 - Iniciadores e condições de amplificação para os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Gênes	Iniciadores	Condições da reação
<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> deleção	<p><i>GSTM1</i>: 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'</p>	<p>94°C-5 min 30 ciclos (94°C-1 min, 59°C-1 min, 72°C-1 min) 72°C-5 min</p>
	<p><i>CYP1A1</i>: 5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'</p>	
	<p><i>GSTT1</i>: 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3' 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'</p>	

Figura 1 - Perfil de PCR Multiplex para os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. 1) marcador de peso molecular de 100pb (Ladder); 2) genótipos *GSTT1*/*GSTM1* positivos; 3) genótipo *GSTT1* positivo; 4) genótipo *GSTM1* positivo; 5) genótipo duplo negativo; 6) controle interno da reação (branco).

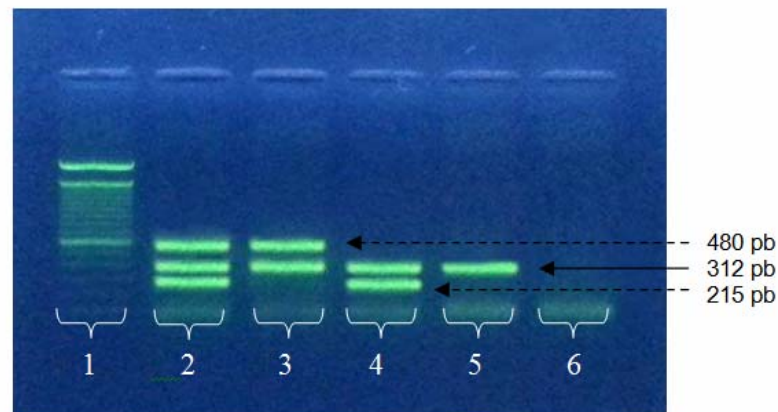
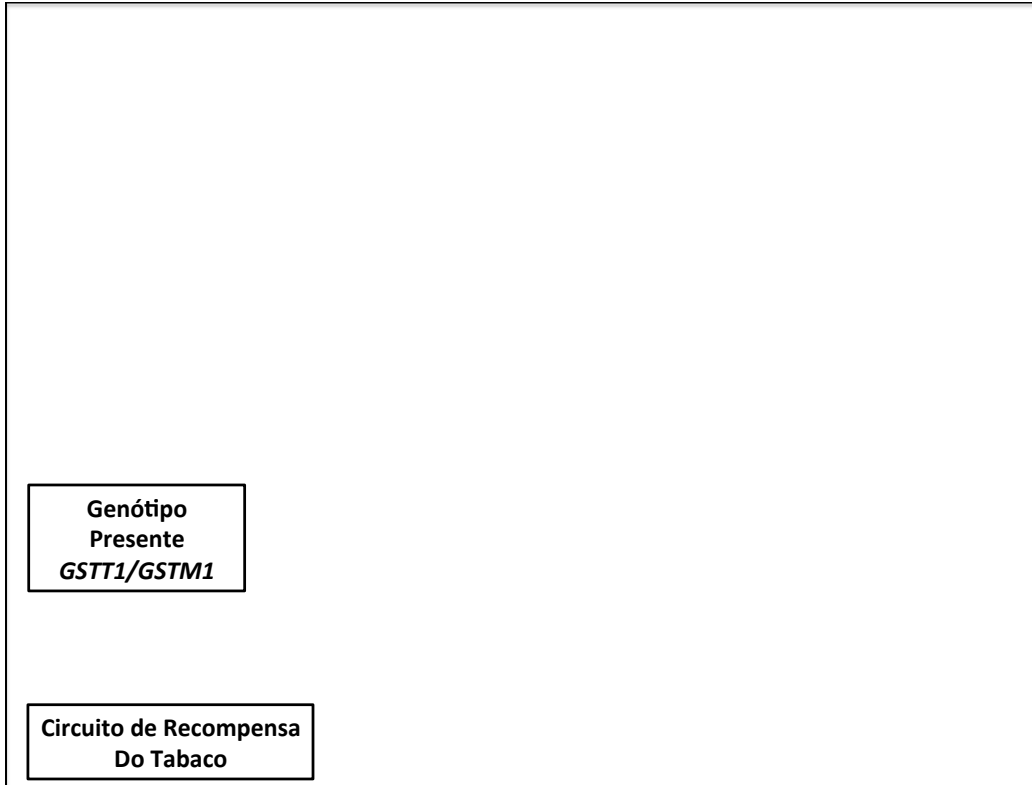


Figura 1 - Novo Paradigma da Fisiopatologia do Transtorno por Uso do Tabaco



TUT : Transtorno por Uso do Tabaco

REFERÊNCIAS

1. OMS. CLASSIFICAÇÃO DE TRANSTORNOS MENTAIS E DE COMPORTAMENTO DA CID-10, PORTO ALEGRE: ARTES MÉDICAS 1993.
2. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. TOBACCO-RELATED DISORDERS OF DSM-5. IN DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS (5TH ED); 2013, p. 571-577.
3. CENTERS FOR DISEASE C., PREVENTION. SMOKING-ATTRIBUTABLE MORTALITY, YEARS OF POTENTIAL LIFE LOST, AND PRODUCTIVITY LOSSES--UNITED STATES, 2000-2004, MMWR MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT 2008: 57: 1226-1228.
4. WARREN G. W., ALBERG A. J., KRAFT A. S., CUMMINGS K. M. THE 2014 SURGEON GENERAL'S REPORT: "THE HEALTH CONSEQUENCES OF SMOKING-50 YEARS OF PROGRESS": A PARADIGM SHIFT IN CANCER CARE, CANCER 2014.
5. GELLERT C., SCHOTTKER B., BRENNER H. SMOKING AND ALL-CAUSE MORTALITY IN OLDER PEOPLE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS, ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE 2012: 172: 837-844.
6. LUSCHER C., UNGLESS M. A. THE MECHANISTIC CLASSIFICATION OF ADDICTIVE DRUGS, PLoS MEDICINE 2006: 3: e437.
7. FOWLER C. D., KENNY P. J. NICOTINE AVERSION: NEUROBIOLOGICAL MECHANISMS AND RELEVANCE TO TOBACCO DEPENDENCE VULNERABILITY, NEUROPHARMACOLOGY 2014: 76 Pt B: 533-544.
8. BELSKY D. W., MOFFITT T. E., BAKER T. B., BIDDLE A. K., EVANS J. P., HARRINGTON H. ET AL. POLYGENIC RISK AND THE DEVELOPMENTAL PROGRESSION TO HEAVY, PERSISTENT SMOKING AND NICOTINE DEPENDENCE: EVIDENCE FROM A 4-DECADE LONGITUDINAL STUDY, JAMA PSYCHIATRY 2013: 70: 534-542.
9. HALL W., MADDEN P., LYNSKEY M. THE GENETICS OF TOBACCO USE: METHODS, FINDINGS AND POLICY IMPLICATIONS, TOBACCO CONTROL 2002: 11: 119-124.
10. HO M. K., TYNDALE R. F. OVERVIEW OF THE PHARMACOGENOMICS OF CIGARETTE SMOKING, THE PHARMACOGENOMICS JOURNAL 2007: 7: 81-98.
11. LI M. D., BURMEISTER M. NEW INSIGHTS INTO THE GENETICS OF ADDICTION, NATURE REVIEWS GENETICS 2009: 10: 225-231.
12. VOLKOW N. D., FOWLER J. S., WANG G. J., SWANSON J. M. DOPAMINE IN DRUG ABUSE AND ADDICTION: RESULTS FROM IMAGING STUDIES AND TREATMENT IMPLICATIONS, MOLECULAR PSYCHIATRY 2004: 9: 557-569.
13. CHATKIN J. M. THE INFLUENCE OF GENETICS ON NICOTINE DEPENDENCE AND THE ROLE OF PHARMACOGENETICS IN TREATING THE SMOKING HABIT, JORNAL BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA : PUBLICACAO OFICIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISILOGIA 2006: 32: 573-579.
14. MACLEOD S. L., CHOWDHURY P. THE GENETICS OF NICOTINE DEPENDENCE: RELATIONSHIP TO PANCREATIC CANCER, WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY : WJG 2006: 12: 7433-7439.
15. FAN J. B., SKLAR P. META-ANALYSIS REVEALS ASSOCIATION BETWEEN SEROTONIN TRANSPORTER GENE STIN2 VNTR POLYMORPHISM AND SCHIZOPHRENIA, MOLECULAR PSYCHIATRY 2005: 10: 928-938, 891.
16. SACCONI N. L., WANG J. C., BRESLAU N., JOHNSON E. O., HATSUKAMI

- D., SACCONI S. F. ET AL. THE CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 NICOTINIC RECEPTOR SUBUNIT GENE CLUSTER AFFECTS RISK FOR NICOTINE DEPENDENCE IN AFRICAN-AMERICANS AND IN EUROPEAN-AMERICANS, *CANCER RESEARCH* 2009: 69: 6848-6856.
17. HATAGIMA A. GENETIC POLYMORPHISMS AND METABOLISM OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN CANCER SUSCEPTIBILITY, *CADERNOS DE SAUDE PUBLICA* 2002: 18: 357-377.
18. WÜNSCH FILHO V., ZAGO M. A. MODERN CANCER EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH: GENETIC POLYMORPHISMS AND ENVIRONMENT, *REVISTA DE SAUDE PUBLICA* 2005: 39: 490-497.
19. CASCORBI I. GENETIC BASIS OF TOXIC REACTIONS TO DRUGS AND CHEMICALS, *TOXICOLOGY LETTERS* 2006: 162: 16-28.
20. MACIEL M. E. GENES DO BIOMETABOLISMO: ASPECTOS POPULACIONAIS EM EURO-DESCENDENTES E AFRO-DESCENDENTES DO SUL DO BRASIL., *DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ* 2007: 112p.
21. HAYES J. D., STRANGE R. C. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS AND THEIR BIOLOGICAL CONSEQUENCES, *PHARMACOLOGY* 2000: 61: 154-166.
22. HAYES J. D., PULFORD D. J. THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE SUPERGENE FAMILY: REGULATION OF GST AND THE CONTRIBUTION OF THE ISOENZYMES TO CANCER CHEMOPROTECTION AND DRUG RESISTANCE, *CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* 1995: 30: 445-600.
23. BUETLER T. M., EATON D. L. GLUTATHIONE S - TRANSFERASES: AMINO ACID SEQUENCE COMPARISON, CLASSIFICATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP, *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART C* 1992: 10: 181-203.
24. BOARD P. G., MENON D. GLUTATHIONE TRANSFERASES, REGULATORS OF CELLULAR METABOLISM AND PHYSIOLOGY, *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* 2013: 1830: 3267-3288.
25. STRANGE R. C., HAYES J. D. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS AND THEIR BIOLOGICAL CONSEQUENCES, *PHARMACOLOGY* 2000: 61: 154-166.
26. RANNUG A., ALEXANDRIE A. K., PERSSON I., INGELMAN-SUNDBERG M. GENETIC POLYMORPHISM OF CYTOCHROMES P450 1A1, 2D6 AND 2E1: REGULATION AND TOXICOLOGICAL SIGNIFICANCE, *JOURNAL OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE / AMERICAN COLLEGE OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE* 1995: 37: 25-36.
27. LANDI S. MAMMALIAN CLASS THETA GST AND DIFFERENTIAL SUSCEPTIBILITY TO CARCINOGENS: A REVIEW, *MUTATION RESEARCH* 2000: 463: 247-283.
28. DUSINSKA M., FICEK A., HORSKA A., RASLOVA K., PETROVSKA H., VALLOVA B. ET AL. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS INFLUENCE THE LEVEL OF OXIDATIVE DNA DAMAGE AND ANTIOXIDANT PROTECTION IN HUMANS, *MUTATION RESEARCH* 2001: 482: 47-55.
29. BOARD P., COGGAN M., JOHNSTON P., ROSS V., SUZUKI T., WEBB G. GENETIC HETEROGENEITY OF THE HUMAN GLUTATHIONE TRANSFERASES: A COMPLEX OF GENE FAMILIES, *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS* 1990: 48: 357-369.
30. PANDYA U., SRIVASTAVA S. K., SINGHAL S. S., PAL A., AWASTHI S., ZIMNIAK P. ET AL. ACTIVITY OF ALLELIC VARIANTS OF PI CLASS HUMAN GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TOWARD CHLORAMBUCIL, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 2000: 278: 258-262.

31. ROSSINI A., RAPOZO D. C., AMORIM L. M., MACEDO J. M., MEDINA R., NETO J. F. ET AL. FREQUENCIES OF GSTM1, GSTT1, AND GSTP1 POLYMORPHISMS IN A BRAZILIAN POPULATION, *GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH : GMR* 2002: 1: 233-240.
32. KUMAR A., YADAV A., GIRI S. K., DEV K., GAUTAM S. K., GUPTA R. ET AL. EFFECT OF GENETIC POLYMORPHISM OF GSTM1 AND GSTT1 GENOTYPES ON CYTOGENETIC BIOMARKERS AMONG COALTAR WORKERS, *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY* 2011: 32: 128-135.
33. WIDERSTEN M., PEARSON W. R., ENGSTROM A., MANNERVIK B. HETEROLOGOUS EXPRESSION OF THE ALLELIC VARIANT MU-CLASS GLUTATHIONE TRANSFERASES MU AND PSI, *THE BIOCHEMICAL JOURNAL* 1991: 276 (Pt 2): 519-524.
34. MATEJIC M., LI D., PRESCOTT N. J., LEWIS C. M., MATHEW C. G., PARKER M. I. ASSOCIATION OF A DELETION OF GSTT2B WITH AN ALTERED RISK OF OESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN A SOUTH AFRICAN POPULATION: A CASE-CONTROL STUDY, *PLOS ONE* 2011: 6: e29366.
35. ARRUDA V. R., GRIGNOLLI C. E., GONCALVES M. S., SOARES M. C., MENEZES R., SAAD S. T. ET AL. PREVALENCE OF HOMOZYGOSITY FOR THE DELETED ALLELES OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE MU (GSTM1) AND THETA (GSTT1) AMONG DISTINCT ETHNIC GROUPS FROM BRAZIL: RELEVANCE TO ENVIRONMENTAL CARCINOGENESIS?, *CLINICAL GENETICS* 1998: 54: 210-214.
36. LI R., BOERWINKLE E., OLSHAN A. F., CHAMBLESS L. E., PANKOW J. S., TYROLER H. A. ET AL. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENOTYPE AS A SUSCEPTIBILITY FACTOR IN SMOKING-RELATED CORONARY HEART DISEASE, *ATHEROSCLEROSIS* 2000: 149: 451-462.
37. GEISLER S. A., OLSHAN A. F., CAI J., WEISSLER M., SMITH J., BELL D. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS AND SURVIVAL FROM HEAD AND NECK CANCER, *HEAD & NECK* 2005: 27: 232-242.
38. BARTSCH H. STUDIES ON BIOMARKERS IN CANCER ETIOLOGY AND PREVENTION: A SUMMARY AND CHALLENGE OF 20 YEARS OF INTERDISCIPLINARY RESEARCH, *MUTATION RESEARCH* 2000: 462: 255-279.
39. NORPPA H. GENETIC SUSCEPTIBILITY, BIOMARKER RESPONSES, AND CANCER, *MUTATION RESEARCH* 2003: 544: 339-348.
40. KADLUBAR F. F. CONCLUDING REMARKS: SYMPOSIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ENVIRONMENTAL TOXICANTS, *MUTATION RESEARCH* 2001: 482: 111-113.
41. MORRIS G A. G., DEAN O, BERK M, GALECKI P, MARTIN-SUBERO M, MAES THE GLUTATHIONE SYSTEM: A NEW DRUG TARGET IN NEURO-IMMUNE DISORDERS, *MOL NEUROBIOL* 2014, IN PRESS.
42. ZIVKOVIC M., STANKOVIC A., DJURIC T., KONCAR I., KOLAKOVIC A., DJURDJEVIC V. ET AL. EFFECTS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1 AND M1 DELETIONS ON ADVANCED CAROTID ATHEROSCLEROSIS, OXIDATIVE, LIPID AND INFLAMMATORY PARAMETERS, *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS* 2014: 41: 1157-1164.
43. WANG J., ZOU L., HUANG S., LU F., LANG X., HAN L. ET AL. GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES GSTM1, GSTT1 AND RISK OF CORONARY HEART DISEASE, *MUTAGENESIS* 2010: 25: 365-369.
44. ABU-AMERO K. K., AL-BOUDARI O. M., MOHAMED G. H., DZIMIRI N. T NULL AND M NULL GENOTYPES OF THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE ARE RISK FACTOR FOR CAD INDEPENDENT OF SMOKING, *BMC MEDICAL GENETICS* 2006: 7: 38.
45. KIM S. J., KIM M. G., KIM K. S., SONG J. S., YIM S. V., CHUNG J. H. IMPACT OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1 AND T1 GENE POLYMORPHISMS ON THE

SMOKING-RELATED CORONARY ARTERY DISEASE, JOURNAL OF KOREAN MEDICAL SCIENCE 2008: 23: 365-372.

46. MANFREDI S., FEDERICI C., PICANO E., BOTTO N., RIZZA A., ANDREASSI M. G. GSTM1, GSTT1 AND CYP1A1 DETOXIFICATION GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO SMOKING-RELATED CORONARY ARTERY DISEASE: A CASE-ONLY STUDY, MUTATION RESEARCH 2007: 621: 106-112.

47. MASETTI S., BOTTO N., MANFREDI S., COLOMBO M. G., RIZZA A., VASSALLE C. ET AL. INTERACTIVE EFFECT OF THE GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES AND CIGARETTE SMOKING ON OCCURRENCE AND SEVERITY OF CORONARY ARTERY RISK, JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 2003: 81: 488-494.

48. OLSHAN A. F., LI R., PANKOW J. S., BRAY M., TYROLER H. A., CHAMBLESS L. E. ET AL. RISK OF ATHEROSCLEROSIS: INTERACTION OF SMOKING AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES, EPIDEMIOLOGY 2003: 14: 321-327.

49. SINGH N., SINHA N., KUMAR S., PANDEY C. M., AGRAWAL S. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE POLYMORPHISM AS A SUSCEPTIBILITY FACTOR FOR ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION AND SMOKING IN THE NORTH INDIAN POPULATION, CARDIOLOGY 2011: 118: 16-21.

50. TAMER L., ERCAN B., CAMSARI A., YILDIRIM H., CICEK D., SUCU N. ET AL. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE POLYMORPHISM AS A SUSCEPTIBILITY FACTOR IN SMOKING-RELATED CORONARY ARTERY DISEASE, BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY 2004: 99: 223-229.

51. WILSON M. H., GRANT P. J., HARDIE L. J., WILD C. P. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1 NULL GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH A DECREASED RISK OF MYOCARDIAL INFARCTION, FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY 2000: 14: 791-796.

52. HE J. Q., CONNETT J. E., ANTHONISEN N. R., PARE P. D., SANDFORD A. J. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE VARIANTS AND THEIR INTERACTION WITH SMOKING ON LUNG FUNCTION, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE 2004: 170: 388-394.

53. UM J. Y., AN N. H., KIM S. H., LEE K. M., KIM Y. S., JANG H. ET AL. GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ISCHEMIC CEREBROVASCULAR DISEASE IN KOREANS, JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE : MN 2003: 20: 31-38.

54. UM J. Y., KIM H. M., HAN S. H., CHO K. H., MOON B. S., HONG S. H. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE POLYMORPHISM AND ISCHEMIC CEREBROVASCULAR DISEASE, THE INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROSCIENCE 2006: 116: 55-65.

55. SANTL LETONJA M., LETONJA M., IKOLAJEVIC-STARCEVIC J. N., PETROVIC D. ASSOCIATION OF MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASES GENOTYPES WITH CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2, INTERNATIONAL ANGIOLOGY : A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL UNION OF ANGIOLOGY 2012: 31: 33-41.

56. GRANDO J., KUASNE H., LOSI-GUEMBAROVSKI R., SANT'ANA RODRIGUES I., MATSUDA H., FUGANTI P. ET AL. ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE BIOMETABOLISM GENES CYP1A1, GSTM1, GSTT1 AND GSTP1 IN BLADDER CANCER, CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE 2009: 9: 21-28.

57. REBBECK T. R. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF THE HUMAN GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENOTYPES GSTM1 AND GSTT1 IN CANCER SUSCEPTIBILITY, CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION 1997: 6: 733-743.

58. NORSKOV M. S., FRIKKE-SCHMIDT R., LOFT S., SILLESEN H., GRANDE P., NORDESTGAARD B. G. ET AL. COPY NUMBER VARIATION IN GLUTATHIONE S-TRANSFERASES M1 AND T1 AND ISCHEMIC VASCULAR DISEASE: FOUR STUDIES AND META-ANALYSES, *CIRCULATION CARDIOVASCULAR GENETICS* 2011: 4: 418-428.
59. LOSI-GUEMBAROVSKI R., COLUS I. M., DE MENEZES R. P., POLISELI F., CHAVES V. N., KUASNE H. ET AL. LACK OF ASSOCIATION AMONG POLYMORPHIC XENOBIOTIC-METABOLIZING ENZYME GENOTYPES AND THE OCCURRENCE AND PROGRESSION OF ORAL CARCINOMA IN A BRAZILIAN POPULATION, *ANTICANCER RESEARCH* 2008: 28: 1023-1028.
60. RODRIGUES I. S., KUASNE H., LOSI-GUEMBAROVSKI R., FUGANTI P. E., GREGORIO E. P., KISHIMA M. O. ET AL. EVALUATION OF THE INFLUENCE OF POLYMORPHIC VARIANTS CYP1A1 2B, CYP1B1 2, CYP3A4 1B, GSTM1 0, AND GSTT1 0 IN PROSTATE CANCER, *UROLOGIC ONCOLOGY* 2011: 29: 654-663.
61. TORRESAN C., OLIVEIRA M. M., TORREZAN G. T., DE OLIVEIRA S. F., ABUAZAR C. S., LOSI-GUEMBAROVSKI R. ET AL. GENETIC POLYMORPHISMS IN OESTROGEN METABOLIC PATHWAY AND BREAST CANCER: A POSITIVE ASSOCIATION WITH COMBINED CYP/GST GENOTYPES, *CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE* 2008: 8: 65-71.
62. LEONARD B., MAES M. 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, *NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS* 2012: 36: 764-785.
63. NUNES S. O., VARGAS H. O., PRADO E., BARBOSA D. S., DE MELO L. P., MOYLAN S. ET AL. THE SHARED ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN MAJOR DEPRESSIVE DISORDER AND NICOTINE DEPENDENCE, *NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS* 2013: 37: 1336-1345.
64. KIM J. H., PARK S. G., LEE K. H., CHOI J. H., HA E. H., MYUNG S. K. ET AL. GSTM1 AND GSTP1 POLYMORPHISMS AS POTENTIAL FACTORS FOR MODIFYING THE EFFECT OF SMOKING ON INFLAMMATORY RESPONSE, *JOURNAL OF KOREAN MEDICAL SCIENCE* 2006: 21: 1021-1027.
65. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PLANO DE IMPLANTAÇÃO DA ABORDAGEM E TRATAMENTO DO TABAGISMO NA REDE SUS PORTARIA GM/MS 1.035/04PORTARIA SAS/MS 442/04
[\[HTTP://WWW.INCA.GOV.BR/TABAGISMO/PUBLICACOES/PLANO_ABORDAGEM_SUS.PDF\]](http://www.inca.gov.br/tabagismo/publicacoes/plano_abordagem_sus.pdf) 2004.
66. ODEBRECHT VARGAS NUNES S., PIZZO DE CASTRO M. R., ODEBRECHT VARGAS H., MENDONÇA VARGAS M., BUENO REZENDE MACHADO R. C., BATISTA FONSECA I. C. ET AL. CLINICAL CHARACTERISTICS AND SMOKING CESSATION: AN ANALYSIS OF SEX AND DEPRESSIVE DISORDERS DIFFERENCES, ADDICTIVE DISORDERS & THEIR TREATMENT 2013: 12: 158-165 110.1097/ADT.1090B1013E31827A31863FF.
67. DEL-BEN C. M., VILELA J. A. A., CRIPPA J. A. D. S., HALLAK J. E. C., LABATE C. M., ZUARDI A. W. CONFIABILIDADE DA "ENTREVISTA CLÍNICA ESTRUTURADA PARA O DSM-IV - VERSÃO CLÍNICA" TRADUZIDA PARA O PORTUGUÊS, *REVISTA BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA* 2001: 23: 156-159.
68. US CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. HEALTH BEHAVIORS OF ADULTS:UNITED STATES, 2005-2007, *VITAL AND HEALTH STATISTICS* 2010: 245: 80.
69. WHO A. W. G. THE ALCOHOL, SMOKING AND SUBSTANCE INVOLVEMENT SCREENING TEST (ASSIST): DEVELOPMENT, RELIABILITY AND

FEASIBILITY, ADDICTION 2002: 97: 1183-1194.

70. HENRIQUE I. F. S., DE MICHELI D., LACERDA R. B. D., LACERDA L. A. D., FORMIGONI M. L. O. D. S. VALIDAÇÃO DA VERSÃO BRASILEIRA DO TESTE DE TRIAGEM DO ENVOLVIMENTO COM ÁLCOOL, CIGARRO E OUTRAS SUBSTÂNCIAS (ASSIST), REVISTA DA ASSOCIACAO MEDICA BRASILEIRA 2004: 50: 199-206.

71. FAGERSTROM K. O., SCHNEIDER N. G. MEASURING NICOTINE DEPENDENCE: A REVIEW OF THE FAGERSTROM TOLERANCE QUESTIONNAIRE, JOURNAL OF BEHAVIORAL MEDICINE 1989: 12: 159-182.

72. CARMO J. T. D., PUEYO A. A. A ADAPTAÇÃO AO PORTUGUÊS DO FAGERSTRÖM TEST FOR NICOTINE DEPENDENCE (FTND) PARA AVALIAR A DEPENDÊNCIA E TOLERÂNCIA À NICOTINA EM FUMANTES BRASILEIROS, RBM REV BRAS MED 2002: 59: 73-80.

73. MENESES-GAYA I. C. D., ZUARDI A. W., LOUREIRO S. R., CRIPPA J. A. D. S. PSYCHOMETRIC PROPERTIES OF THE FAGERSTRÖM TEST FOR NICOTINE DEPENDENCE, JORNAL BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA 2009: 35: 73-82.

74. STORR C. L., REBOUSSIN B. A., ANTHONY J. C. THE FAGERSTROM TEST FOR NICOTINE DEPENDENCE: A COMPARISON OF STANDARD SCORING AND LATENT CLASS ANALYSIS APPROACHES, DRUG AND ALCOHOL DEPENDENCE 2005: 80: 241-250.

75. REICHERT J. A., ALBERTO JOSÉ DE; GONÇALVES, CRISTINA MARIA CANTARINO;GODOY, IRMA; CHATKIN, JOSÉ MIGUEL; SALES, MARIA DA PENHA UCHOA;SANTOS, SERGIO RICARDO RODRIGUES DE ALMEIDA. SMOKING CESSATION GUIDELINES, J BRAS PNEUMOL 2008: 34: 845-880.

76. SANTOS U. P., GANNAM S., ABE J. M., ESTEVES P. B., FREITAS FILHO M., WAKASSA T. B. ET AL. EMPREGO DA DETERMINAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO NO AR EXALADO PARA A DETECÇÃO DO CONSUMO DE TABACO, JORNAL DE PNEUMOLOGIA 2001: 27: 231-236.

77. MIDDLETON E. T., MORICE A. H. BREATH CARBON MONOXIDE AS AN INDICATION OF SMOKING HABIT, CHEST 2000: 117: 758-763.

78. ABDEL-RAHMAN S. Z., EL-ZEIN R. A., ANWAR W. A., AU W. W. A MULTIPLEX PCR PROCEDURE FOR POLYMORPHIC ANALYSIS OF GSTM1 AND GSTT1 GENES IN POPULATION STUDIES, CANCER LETTERS 1996: 107: 229-233.

79. EZZATI M., LOPEZ A. D. ESTIMATES OF GLOBAL MORTALITY ATTRIBUTABLE TO SMOKING IN 2000, LANCET 2003: 362: 847-852.

80. SAADAT M., MOHABATKAR H. POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES M1 AND T1 DO NOT ACCOUNT FOR INTERINDIVIDUAL DIFFERENCES FOR SMOKING BEHAVIOR, PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR 2004: 77: 793-795.

81. WANG J., ZOU L., HUANG S., LU F., LANG X., HAN L. ET AL. GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES GSTM1, GSTT1 AND RISK OF CORONARY HEART DISEASE, MUTAGENESIS 2010: 25: 365-369.

82. US CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. QUITTING SMOKING AMONG ADULTS:UNITED STATES, 2001-2010, MMWR MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT 2011: 60(44): 1513-1519.

83. WHO A. W. G. THE ALCOHOL, SMOKING AND SUBSTANCE INVOLVEMENT SCREENING TEST (ASSIST): DEVELOPMENT, RELIABILITY AND FEASIBILITY, ADDICTION 2002: 97 1183-1194.

84. PAMPEL F. C., KRUEGER P. M., DENNEY J. T. SOCIOECONOMIC DISPARITIES IN HEALTH BEHAVIORS, ANNUAL REVIEW OF SOCIOLOGY 2010: 36: 349-370.

85. MAES M., KUBERA M., OBUCHOWICZWA E., GOEHLER L., BRZESZCZ J.

DEPRESSION'S MULTIPLE COMORBIDITIES EXPLAINED BY (NEURO)INFLAMMATORY AND OXIDATIVE & NITROSATIVE STRESS PATHWAYS, *NEURO ENDOCRINOLOGY LETTERS* 2011: 32: 7-24.

86. PERKINS K. A., LERMAN C., GROTTENTHALER A., CICCOCIOPPO M. M., MILANAK M., CONKLIN C. A. ET AL. DOPAMINE AND OPIOID GENE VARIANTS ARE ASSOCIATED WITH INCREASED SMOKING REWARD AND REINFORCEMENT OWING TO NEGATIVE MOOD, *BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY* 2008: 19: 641-649.

87. PETROVIC D., PETERLIN B. GSTM1-NULL AND GSTT1-NULL GENOTYPES ARE ASSOCIATED WITH ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES, *CLINICAL BIOCHEMISTRY* 2014.

88. INGRAM C. J., MULCARE C. A., ITAN Y., THOMAS M. G., SWALLOW D. M. LACTOSE DIGESTION AND THE EVOLUTIONARY GENETICS OF LACTASE PERSISTENCE, *HUMAN GENETICS* 2009: 124: 579-591.

89. BEJA-PEREIRA A., LUIKART G., ENGLAND P. R., BRADLEY D. G., JANN O. C., BERTORELLE G. ET AL. GENE-CULTURE COEVOLUTION BETWEEN CATTLE MILK PROTEIN GENES AND HUMAN LACTASE GENES, *NATURE GENETICS* 2003: 35: 311-313.

90. SULLIVAN P. F. SPURIOUS GENETIC ASSOCIATIONS, *BIOLOGICAL PSYCHIATRY* 2007: 61: 1121-1126.