

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Caroline de Lima Mota

Estudo dos efeitos dos polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNA3* e *TaqIA* no comportamento do tabagismo em brasileiros, residentes em Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ

Rio de Janeiro

2020

Caroline de Lima Mota

Estudo dos efeitos dos polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNA3* e *TaqIA* no comportamento do tabagismo em brasileiros, residentes em Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Simone Mitri Nogueira

Rio de Janeiro

2020

Título do trabalho em inglês: **Study of the effects of *CHRNA5*, *CHRNA3* and *TaqIA* polymorphisms on smoking behavior in Brazilians from Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ.**

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

M917e Mota, Caroline de Lima.
Estudo dos efeitos dos polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNA3* e *TaqIA* no comportamento do tabagismo em brasileiros, residentes em Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ / Caroline de Lima Mota. — 2020.
124 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Josino Costa Moreira.
Coorientadora: Simone Mitri Nogueira.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2020.

1. Tabagismo. 2. Saúde Pública. 3. Polimorfismo Genético.
4. Receptores Nicotínicos. 5. Receptores de Dopamina D2. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.865098153

Caroline de Lima Mota

**Estudo dos efeitos dos polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNA3* e *TaqIA* no comportamento do
1tabagismo em brasileiros, residentes em Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 8 de Outubro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr., Alberto José de Araújo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr., André Luiz Oliveira da Silva
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Prof. Dr., Eduardo Mere Del Aguila
Weill Cornell Medicine

Prof.^a Dra., Cristiane Barata Silva
Instituto nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof.^a Dra., Simone Mitri Nogueira (Coorientadora)
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof. Dr., Josino Costa Moreira (Orientador)
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que me sustentou, me capacitou e esteve comigo em cada detalhe desta jornada. Obrigada Senhor por ser meu refúgio e fortaleza e, por sempre fazer por mim muito além do que eu poderia imaginar.

Agradeço também a minha família, que sempre torceu por mim, me incentivou e apoiou. Sei que cada conquista também é uma vitória para vocês. Saber que posso contar com vocês, com certeza, é meu porto seguro. Obrigada especial a minha mãe, meu pai, meu irmão e minha vó Tereza. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Outro agradecimento especial é para meu marido Anderson, que esteve comigo em todos os momentos, nas conquistas e nos momentos difíceis. Agradeço por ter me ajudado a concluir esta tese e por ser meu principal ouvinte. Obrigada pela paciência e companheirismo.

Também agradeço à Helena, que sem dúvida foi meu maior incentivo e motivação. Seu bem estar se tornou o combustível para alcançar meus objetivos, minha filha. Você é o meu maior e melhor projeto, que nasceu no coração de Deus.

Não poderia deixar de agradecer aos colegas de laboratório do CESTEh, saibam que sempre lembrarei de cada um de vocês com muito carinho. Vocês me fizeram crescer profissional e pessoalmente. Especialmente, quero agradecer ao meu querido orientador Josino, que nunca mediu esforços para me ajudar; a minha colega-amiga de trabalho Cristiane, que esteve comigo e sempre pude contar, e a minha orientadora Simone.

Simone, eu jamais poderei agradecer por tudo o que me ensinou com tanta paciência e cumplicidade, não só em relação ao trabalho, mas também para vida. Obrigada pela confiança e por sua disponibilidade.

Por fim, agradeço a todos que contribuíam direta ou indiretamente para conclusão desta tese. Obrigada aos moradores de Campos Elíseos que voluntariamente participaram desta pesquisa, os quais criei um carinho especial.

*A cada tragada,
Entra um pouco de fantasia,
Ainda que efêmera alegria,
No véu de fumaça inalada...
A cada expirada,
Descortina-se mais a teimosia,
Ainda que conheça esta avaria,
Que se instala em lenta agonia...
A cada caminhada,
Tenta superar esta ambivalência,
Ainda que aconteça a recaída,
Que valha a pena a tentativa...
ARAÚJO, 2005.*

*“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos,
de acordo com o seu poder que atua em nós, a ele seja a glória na igreja e em Cristo
Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!”.*

EFÉSIOS 3: 20-21

RESUMO

O tabagismo é um grave problema de Saúde Pública, considerado a principal causa de morte evitável no mundo. A nicotina presente no cigarro estimula a liberação de dopamina, que é o neurotransmissor chave na dependência tabágica devido ao seu papel nos mecanismos de recompensa cerebral. Desta forma, genes que afetam a atividade e/ou expressão de proteínas associadas à transmissão dopaminérgica podem exercer influência no comportamento do tabagismo. O objetivo desta tese foi investigar o efeito dos polimorfismos dos genes dos receptores nicotínicos, *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776, e do receptor de dopamina, *TaqIA* rs1800497 no comportamento do tabagismo em brasileiros residentes no distrito de Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ. Para alcançar os objetivos foram avaliados 449 indivíduos, sendo 66,4% Nunca fumantes, 12,2% Fumantes atuais e 21,4% Ex-fumantes. O trabalho realizado possibilitou a redação de três artigos, que compõem esta tese. O primeiro artigo foi uma revisão integrativa que avaliou a variabilidade genética na neurobiologia do tabagismo e seus efeitos no comportamento tabágico. Foi observada a relevância de polimorfismos em genes relacionados ao sistema de recompensa dopaminérgico (*CYP2A6*, *CHRN*s, *DRD*s, *SLC6A3*, *DBH*, *COMT*, *MAO*) e a influência sobre as características tabágicas, como número de cigarros consumidos, grau de dependência, idade de iniciação e chance de cessação. Combinações entre genótipos de diferentes polimorfismos também se destacaram, mostrando que interações gênicas podem determinar um perfil genético de predisposição ao vício. Os estudos subsequentes foram do tipo transversal e avaliaram a associação entre os polimorfismos selecionados e tabagismo, utilizando como testes estatísticos, regressão logística e linear ajustadas por variáveis de confundimento. O segundo artigo, que investigou o efeito do polimorfismo *TaqIA*, revelou que o alelo variante *T* estava associado à idade de início do tabagismo mais tardia em comparação a *CC* (16,97 vs. 15,09; IC 95%: 15,75-18,19; $p=0,02$). O alelo *T* também foi associado à maior chance de cessação em mulheres (OR= 3,17; 95% IC: 1,06-9,45; $p=0,04$). O terceiro artigo, que avaliou o efeito dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776, mostrou que mulheres portadoras do genótipo variante *AA* do *CHRNA5* tinham um risco aumentado de serem fumantes (OR: 3,09; IC 95%: 1,09-8,76; $p=0,033$). O genótipo variante *TT* de *CHRNA3* mostrou proteção contra o tabagismo na população total e no grupo feminino (OR: 0,41; IC 95%: 0,19-0,88; $p=0,022$). O gênero e a etnia são fatores que interferiram no efeito dos polimorfismos estudados sobre o tabagismo. Os dados da presente tese podem contribuir para um melhor entendimento da influência genética no comportamento tabágico e para melhoria dos tratamentos de cessação disponíveis.

Palavras-chave: Tabagismo; Saúde Pública; Polimorfismo genético; Receptores nicotínicos; Receptores de dopamina D2.

ABSTRACT

Smoking is a serious public health problem, considered the leading cause of preventable death worldwide. The nicotine present in cigarettes stimulates the release of dopamine, which is the key neurotransmitter implicated in smoking addiction, due to its role in brain reward mechanisms. Thus, genes that affect the activity and/or expression of proteins associated with dopaminergic transmission can influence smoking behavior. The aim of this thesis was to investigate the effect of nicotinic receptor genes *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 polymorphisms and of the dopamine receptor, *TaqIA* rs1800497 on the smoking behavior of Brazilians living in the Campos Elíseos district, in Duque de Caxias, RJ. To achieve the objectives, 449 individuals were evaluated, of which 66.4% were never smokers, 12.2% were current smokers and 21.4%, former smokers. These assessments resulted in three papers which make up this thesis. The first comprised an integrative review that evaluated smoking neurobiology genetic variability and its effects on smoking behavior. A relevance of polymorphisms in genes associated to the dopaminergic reward system (*CYP2A6*, *CHRN*s, *DRD*s, *SLC6A3*, *DBH*, *COMT*, *MAO*) and the influence on smoking characteristics, such as number of consumed cigarettes, dependence degree, initiation age and cessation chance were observed. Combinations between the genotypes of different polymorphisms were also noteworthy, indicating that gene interactions can determine an addiction predisposition genetic profile. The subsequent studies comprised transversal type assessments and evaluated the associations between the selected polymorphisms and smoking, applying logistic and linear regressions adjusted by confounding variables as the statistical tests. The second paper, which investigated the effect of *TaqIA* polymorphism, revealed that the *T* allele variant was associated to a later age of smoking initiation compared to *CC* (16.97 vs. 15.09; 95% CI: 15.75- 18.19; $p = 0.02$). The *T* allele was also associated with a higher chance of cessation in women (OR = 3.17; 95% CI: 1.06-9.45; $p = 0.04$). The third paper, which assessed the effect of the *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 polymorphisms, indicated that women presenting the *CHRNA5 AA* variant genotype exhibit an increased risk of being smokers (OR: 3.09; 95% CI: 1.09-8, 76; $p = 0.033$). The *TT CHRNA3* variant genotype indicated protection against smoking in the total population and in the female group (OR: 0.41; 95% CI: 0.19-0.88; $p = 0.022$). Gender and ethnicity interfered in the effect of the evaluated polymorphisms on smoking. The data from this thesis can contribute to a better understanding of the genetic influence on smoking behavior and improve the available cessation treatments.

Keywords: Tobacco Use Disorder, Public Health, Polymorphism, Genetic, Nicotinic receptors, Receptors Dopamine D2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Doenças e consequências à saúde associadas ao tabagismo.....	19
Figura 2 -	Doenças e consequências à saúde associadas ao tabagismo passivo.....	20
Figura 3 -	Principais doenças e respectivos números de doentes por causas atribuíveis ao tabagismo.....	21
Figura 4 -	Mortes anuais atribuíveis ao tabaco.....	22
Figura 5 -	Custos totais gastos com assistência médica e perda de produtividade associados ao tabagismo por ano no Brasil.....	23
Figura 6 -	Representação da estrutura molecular da nicotina.....	27
Figura 7 -	Representação do mecanismo de ativação do sistema de recompensa dopaminérgico pela nicotina.....	29
Figura 8 -	Representação da ligação da nicotina aos nAChRs.....	32
Figura 9 -	Representação da estrutura dos nAChRs.....	33
Figura 10 -	Polimorfismos rs1051730 e rs16969968 no cluster <i>CHRNA5/A3/B4</i>	35
Figura 11 -	Representação das famílias de receptores de dopamina.....	37
Figura 12 -	Representação da cascata de sinalização da dopamina.....	38
Figura 13 -	Localização de <i>SNPs</i> nos genes <i>ANKK1</i> e <i>DRD2</i>	39
Figura 14 -	Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo <i>CHRNA5</i> rs16969968 por PCR em tempo real.....	47
Figura 15 -	Curvas de emissão de fluorescência do polimorfismo <i>CHRNA5</i> rs16969968.....	48
Artigo 1, Figura 1 -	Identification, selection and inclusion of scientific articles.....	54
Artigo 1, Figura 2 -	Activation of the dopaminergic reward system by nicotine.....	56
Artigo 3, Figura 1 -	Age of smoking initiation among genotypes for <i>CHRNA3</i> rs578776.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Substâncias carcinógenas presentes no cigarro conforme a <i>International Agency for Research on Cancer (IARC)</i>	26
Tabela 2 -	Sondas utilizadas para o ensaio de genotipagem dos polimorfismos em estudo.....	46
Artigo 1, Tabela 1 -	Neurobiological genetic polymorphisms associated with smoking behavior.....	63
Artigo 2, Tabela 1 -	Características sociodemográficas da população do estudo, n=449, 2016-2019.....	83
Artigo 2, Tabela 2 -	Associação entre <i>TaqIA</i> rs1800497 e o risco para o tabagismo, n=449, 2016-2019.....	84
Artigo 2, Tabela 3-	Associação entre <i>TaqIA</i> rs1800497 e características do comportamento tabágico, n=146 para Idade de início, n=51 para CPD e FTND, 2016-2019.....	85
Artigo 2, Tabela 4 -	Associação entre <i>TaqIA</i> rs1800497 e a cessação do tabagismo, n=151, 2016-2019.....	86
Artigo 3, Tabela 1-	Sociodemographic characteristics of the study population.....	94
Artigo 3, Tabela 2 -	Association between genotypes and risk of smoking.....	95
Artigo 3, Tabela 3 -	Polymorphism association with age of smoking initiation.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANKK1	<i>Repeat and kinase domain containing 1</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CHRN	Receptor nicotínico colinérgico
CID-10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CONICQ	Comissão Nacional para Implementação da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco
CPD	Número de cigarros consumidos por dia
CQCT	Convenção Quadro para o Controle do Tabaco
CYP2A6	Citocromo P450A6
D2L	Proteína D2 longa
D2S	Proteína D2 curta
DAT	Transportadores de dopamina
DBH	Dopamina B-hydroxylase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DRDs	Receptores dopaminérgicos
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FTND	Teste de dependência nicotínica de Fagerström
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Gi	Proteína G inibitória
Glu	Glutamato
Gs	Proteína G estimulatória
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBOPE	Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	Kilobases
Lys	Lisina
MAO	Monoaminoxidase
nAChRs	Receptores nicotínico de acetilcolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PIB	Produto Interno Bruto
PKA	Proteína quinase A
PNCT	Programa Nacional de Controle do Tabagismo
REDUC	RefinaRia de Duque de Caxias
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TH	Tirosina hidroxilase
TRN	Terapia de reposição de nicotina
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

LISTA DE SÍMBOLOS

Na ⁺	Sódio
χ^2	Teste Qui-quadrado
nM	Nano Molar
Ca ²⁺	Cálcio
K ⁺	Potássio
nM	Nano Molar
ng/ μ L	Nano grama por Microlitro
°C	Graus Célsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO TABAGISMO.....	15
2.2	DOENÇAS RELACIONADAS AO TABAGISMO.....	18
2.3	CUSTOS RELACIONADOS AO TABAGISMO.....	22
2.4	TERAPIAS DE CESSAÇÃO DO TABAGISMO.....	23
2.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO.....	25
2.6	BASE NEUROBIOLÓGICA DA ADICÇÃO.....	27
2.7	DETERMINANTES GENÉTICOS DO TABAGISMO.....	30
2.8	POLIMORFISMOS NOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA.....	31
2.9	POLIMORFISMOS RELACIONADOS AOS RECEPTORES DE DOPAMINA.....	36
3	JUSTIFICATIVA	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	OBJETIVO GERAL.....	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
5	MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	44
5.2	COLETA DE DADOS.....	44
5.2.1	Questionário	44
5.2.1.1	<i>Status</i> tabágico.....	45
5.2.1.2	Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTDN).....	45
5.2.2	Amostras sanguíneas	45
5.3	DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS.....	45
5.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
5.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	49
6	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	50
6.1	PRIMEIRO ARTIGO DA TESE.....	50
6.2	SEGUNDO ARTIGO DA TESE.....	79
6.3	TERCEIRO ARTIGO DA TESE.....	91

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICE - QUESTIONÁRIO.....	121

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é uma das maiores ameaças à Saúde Pública que o mundo já enfrentou e, ainda na atualidade, constitui um desafio a ser enfrentado. É considerado uma doença crônica e está associado ao desenvolvimento de muitos tipos de doenças incapacitantes e fatais. No Brasil e no mundo, o tabagismo representa um alto custo social e econômico devido a despesas médicas, internações e perda de produtividade laboral (USDHHS, 2014; PINTO et al., 2017; WHO, 2020).

De acordo com a décima revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS), o fumo de tabaco é classificado como uma dependência química e está inserido no grupo dos transtornos mentais e de comportamento decorrentes do uso de substâncias psicoativas (INCA, 2007; ARAUJO et al., 2012).

O cigarro industrial é a principal forma de consumo de tabaco (WHO, 2020). Dentre as mais de 9000 substâncias que fazem parte da sua composição, a nicotina é identificada como a substância responsável pelos efeitos geradores da dependência (RODGMAN & PERFETTI, 2013; USDHHS, 2014). Na presença da nicotina, ocorre um aumento no fluxo de dopamina no sistema mesolímbico cerebral, ativando os circuitos que regulam as sensações de prazer e recompensa (BENOWITZ, 2010; WONNACOTT; SIDHPURA; BALFOUR, 2005).

O tabagismo é influenciado pela combinação de fatores ambientais e genéticos, o que parece ser determinante tanto para iniciação e manutenção do hábito, quanto para o sucesso de cessação (BATRA et al., 2003; HO; TYNDALE, 2007; KREEK; NIELSEN; LAFORGE, 2004; MUNAFÒ et al., 2004). Neste sentido, o estudo da variabilidade genética envolvida na neurobiologia do fumo de tabaco pode ajudar a entender as diferenças interindividuais do comportamento tabágico (BIERUT; TYNDALE, 2018; SALLOUM et al., 2018).

Os genes envolvidos na rota dopaminérgica têm sido investigados devido ao papel do neurotransmissor na dependência do tabaco (CLAGUE et al., 2010; MA et al., 2015a). Dentre eles, os relacionados aos receptores nicotínicos de acetilcolina e aos receptores de dopamina têm recebido maior atenção (CLAGUE et al., 2010; MA et al., 2015; KITA-MILCZARSKA; SIEMINSKA; JASSEN, 2016; PEDNEAULT et al., 2014).

O mecanismo molecular da ativação do sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico se inicia pela ligação da nicotina, de forma agonista, aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), que promove o aumento da concentração de dopamina e outros

neurotransmissores, especialmente no núcleo accumbens (BENOWITZ, 2010; GOLAN, 2009; WONNACOTT; SIDHPURA; BALFOUR, 2005). A dopamina liberada interage com seus receptores, transmitindo o sinal pós-sinápticamente. Assim, alterações em genes que modificam a função destas proteínas podem interferir na neurotransmissão dopaminérgica e são alvos de pesquisas sobre o comportamento adictivo ao tabaco (BATRA et al., 2003; HERMAN et al., 2014; LEWIS; MILLER; LEA, 2007; MA et al., 2015a).

Diante da problemática e dos fatores ambientais e genéticos relacionados a susceptibilidade ao tabagismo, justifica-se o interesse em investigar variações genéticas envolvidas no sistema de recompensa cerebral dopaminérgico.

Assim, o presente trabalho é composto pelos três artigos elaborados que abordam a variabilidade genética da neurobiologia da adicção à nicotina e a identificação de fatores de risco genéticos associados ao comportamento tabágico em uma população de brasileiros residentes em uma área carente de saneamento básico e contaminada por emissões industriais onde o consumo de cigarros representa um risco adicional à saúde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO TABAGISMO

O tabagismo é a principal causa de morte evitável no mundo (WHO, 2020), responsável por mais de 8 milhões de mortes por ano, e destas, 1,2 milhões são de não fumantes expostos ao fumo passivo (WHO; 2019; 2020). Em 2017, foi associado a 12,6% do total de mortes que ocorreram no Brasil (PINTO et al., 2017). A epidemia do tabagismo foi iniciada e tem sido sustentada por agressivas estratégias da indústria do tabaco (DROPE, et al., 2018; SILVA, 2019; USDHHS, 2014).

Os esforços de diversas organizações científicas e a adoção de medidas de combate ao tabagismo fizeram com que a prevalência global do tabagismo diminuísse ao longo dos anos. Entretanto, aproximadamente dois terços dos países, incluindo 98% dos países de baixo IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) e 93% dos países da África subsaariana, ainda não implementaram as melhores práticas de monitoramento da prevalência de uso de tabaco. O monitoramento efetivo deve ser prioridade para os governos, pois é essencial para estimar a prevalência do tabagismo e avaliar o sucesso das políticas de controle do tabagismo (DROPE et al., 2018).

Atualmente ainda permanecem grandes disparidades no uso de tabaco entre os diferentes grupos definidos por etnias, nível educacional e socioeconômico (USDHHS, 2014). São observadas tendências alarmantes no uso de tabaco entre os jovens e em países de baixa renda (DROPE et al, 2018). A estimativa é que existam 1,1 bilhões de fumantes e que 80% dessas pessoas vivam em países de renda baixa ou média (WHO, 2019).

A epidemia do tabagismo no Brasil acelerou-se a partir da década de 1970. Entre 1970 e 1986, o número de cigarros vendidos cresceu 132%, num período em que a população adulta cresceu apenas 69%. A partir de então, iniciativas para enfrentar o problema do tabagismo foram sendo elaboradas e implementadas (ROMERO; SILVA, 2011).

Os primeiros movimentos do controle do tabagismo no país se iniciaram na década de 1960, a partir do debate sobre as doenças relacionadas ao tabaco. Em 1979, houve por parte das sociedades médicas a primeira manifestação de caráter nacional contra o tabagismo, com a carta de Salvador, que pressionou o Ministério da Saúde a criar um programa nacional para o controle

do tabagismo (ARAÚJO, 2012; MENEZES; ACHUTTI, 2000; PORTES et al., 2018). Em meados da década de 1980, as ações voltadas para o “combate ao fumo” no Brasil eram ainda pouco articuladas. Em 1986 surgiu a primeira Lei Federal de controle do tabagismo do país, a lei de nº 7.488, de 11 de junho de 1986, que determinava que o Poder Executivo promovesse uma campanha de âmbito nacional, visando a alertar a população sobre os malefícios do uso do cigarro, na semana que antecede o dia 29 de agosto, declarado Dia Nacional de Combate ao Fumo (ROMERO; SILVA, 2011).

Desde 1989, o Ministério da Saúde articula, através do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), ações nacionais que compõem o Programa Nacional de Controle do Tabagismo (PNCT). O objetivo é reduzir a prevalência de fumantes e a consequente morbimortalidade relacionada ao consumo de derivados do tabaco no Brasil. Este Programa articula a Rede de tratamento do tabagismo no SUS, o Programa Saber Saúde, as campanhas e outras ações educativas e a promoção de ambientes livres (INCA, 2007; INCA, 2020a).

A Assembleia Mundial da Saúde elaborou o primeiro Tratado Internacional de Saúde Pública, a Convenção Quadro para o Controle do Tabaco (CQCT) da OMS, em maio de 1996. Este Tratado foi negociado de 1999 a 2003 com 192 países e entrou em vigor em 2005 com a adesão de 40 países, incluindo o Brasil (CQCT, 2003; CAVALCANTE, 2005; INCA, 2007).

A fim de responder a globalização da epidemia do tabaco, o principal objetivo da convenção é:

“Proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco, proporcionando uma referência para as medidas de controle do tabaco, a serem implementadas pelas Partes nos níveis nacional, regional e internacional, a fim de reduzir de maneira contínua e substancial a prevalência do consumo e a exposição à fumaça do tabaco” (CQCT, 2003).

Entre as principais medidas da Convenção Quadro para o Controle do Tabaco estão: proteger a população contra a exposição à fumaça do tabaco em ambientes fechados; regulamentar os conteúdos e emissões dos produtos; desenvolver programas de educação e

conscientização sobre os malefícios do tabagismo; proibir a publicidade, promoção e patrocínio dos produtos de tabaco; implementar programas de tratamento da dependência da nicotina; promover medidas de preços e impostos eficientes para redução do consumo e eliminar o contrabando; restringir o acesso dos produtos para os jovens; e proteger o meio ambiente e a saúde do trabalhador dos riscos causados pelas atividades de produção de tabaco (CQCT, 2003).

Para ajudar os países a implementar a Convenção-Quadro, a OMS lançou um pacote de intervenções para redução de demanda de produtos de tabaco, denominado MPOWER, constituído por iniciais das palavras inglesas e seus respectivos significados (WHO, 2008; ARAÚJO, 2012):

- **Monitor:** Monitorar o uso de tabaco e políticas de prevenção;
- **Protect:** Proteger a população contra a fumaça do tabaco;
- **Offer:** Oferecer ajuda para cessação do fumo;
- **Warn:** Advertir sobre os perigos do tabaco;
- **Enforce:** Fazer cumprir as proibições sobre publicidade, promoção e patrocínio;
- **Raise:** Aumentar os impostos sobre o tabaco.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem uma participação essencial com competência legal para avaliar, regulamentar e controlar os produtos de tabaco, bem como os riscos associados à saúde. Dentre essas ações para controle do tabagismo estão a proibição da propaganda nos meios de comunicação, do uso de cartazes e pôsteres nos pontos de venda e do patrocínio de eventos culturais e esportivos; a inserção de imagens de advertências nas embalagens; regras para o registro destes produtos; aumento da tributação (SILVA, 2019).

O Brasil foi um dos primeiros países a regular a descrição, o conteúdo e as emissões dos produtos derivados do tabaco e a adotar imagens de advertência nas embalagens de cigarros (PORTES et al., 2018). É considerado uma referência internacional no controle do tabaco e foi o segundo país, depois da Turquia, a implementar integralmente todas as medidas MPOWER, segundo o relatório da OMS lançado em 2019 (WHO, 2019).

A prevalência de fumantes no Brasil vem diminuindo em 26 estados brasileiros e Distrito Federal, como mostram as pesquisas realizadas pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL). De 2006 a 2019, esta

prevalência diminuiu de 16,2% para 9,8% em maiores de 18 anos (VIGITEL et al., 2007; VIGITEL et al., 2020), sendo maior no sexo masculino (12,3%) do que no feminino (7,7%). Contudo, de acordo com a pesquisa realizada em 2019, a proporção de adultos fumantes aumentou 0,5% em comparação à 2018 (VIGITEL et al., 2007; VIGITEL et al., 2018).

A pesquisa VIGITEL 2019 também mostrou que a frequência de fumantes tendeu a ser maior entre os adultos na faixa etária entre 25 e 64 anos (VIGITEL et al., 2020). Além disso, o estudo relatou que a frequência do hábito de fumar diminuiu com o aumento da escolaridade e foi particularmente alta entre homens e mulheres com até oito anos de escolaridade (16,8% e 11,3%, respectivamente), excedendo em cerca de duas vezes a frequência observada entre indivíduos com 12 ou mais anos de estudo (VIGITEL et al., 2020).

No conjunto da população analisada, a frequência de fumantes passivos no domicílio foi de 6,8%, sendo semelhante nos dois sexos, com nível máximo entre os mais jovens (18 a 24 anos). No local de trabalho, a frequência de fumantes passivos foi de 6,6%, sendo maior entre homens (10,0%) do que nas mulheres (3,7%), e mais expressiva entre indivíduos com mais de 65 anos. Além disso, entre homens, a frequência de fumantes passivos no local de trabalho diminuiu com o aumento da escolaridade, enquanto para as mulheres aumentou (VIGITEL et al., 2020).

A diminuição da prevalência do tabagismo no Brasil, mais expressiva entre os homens do que entre as mulheres, trouxe uma nova preocupação para a saúde pública, considerando os prejuízos à saúde da mulher e o aumento das doenças tabaco-relacionadas (INCA, 2017; INCA, 2020b). Embora o consumo geral tenha diminuído nos últimos anos, o caminho futuro do controle global do tabaco ainda é incerto e as projeções futuras são preocupantes (INCA, 2018).

2.2 DOENÇAS RELACIONADAS AO TABAGISMO

O tabagismo é fator causal de diversos tipos de doenças incapacitantes e fatais. O conhecimento sobre as consequências para a saúde tem sido expressivamente expandido ao longo dos anos (USDHHS, 2014) (Figura 1).

De fato, o tabaco também é associado a diversos tipos de cânceres, que no Brasil é a segunda causa de morte por doença, responsável por grande sofrimento e gastos com

tratamentos e internações hospitalares. Além disso, 90% dos casos de câncer de pulmão ocorrem em fumantes e 30% de todos os outros tipos de câncer têm sido associados ao tabagismo (NUNES, 2010). Outras localizações neoplásicas relacionados ao tabagismo incluem cabeça e pescoço, bexiga, pâncreas, estômago, fígado, rins, colo uterino e leucemias (IARC, 2004; USDHHS, 2014).

Além disso, o tabagismo está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, entre elas: cardiovascular, periodontal, doenças do sistema reprodutor feminino, doenças autoimune e diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças respiratórias como asma, tuberculose e fibrose pulmonar (INCA, 2007; WHO, 2008), além de maior risco do desenvolvimento de sintomas graves em caso de contaminação pelo novo coronavírus, causador da Covid-19 (SILVA et al., 2020).

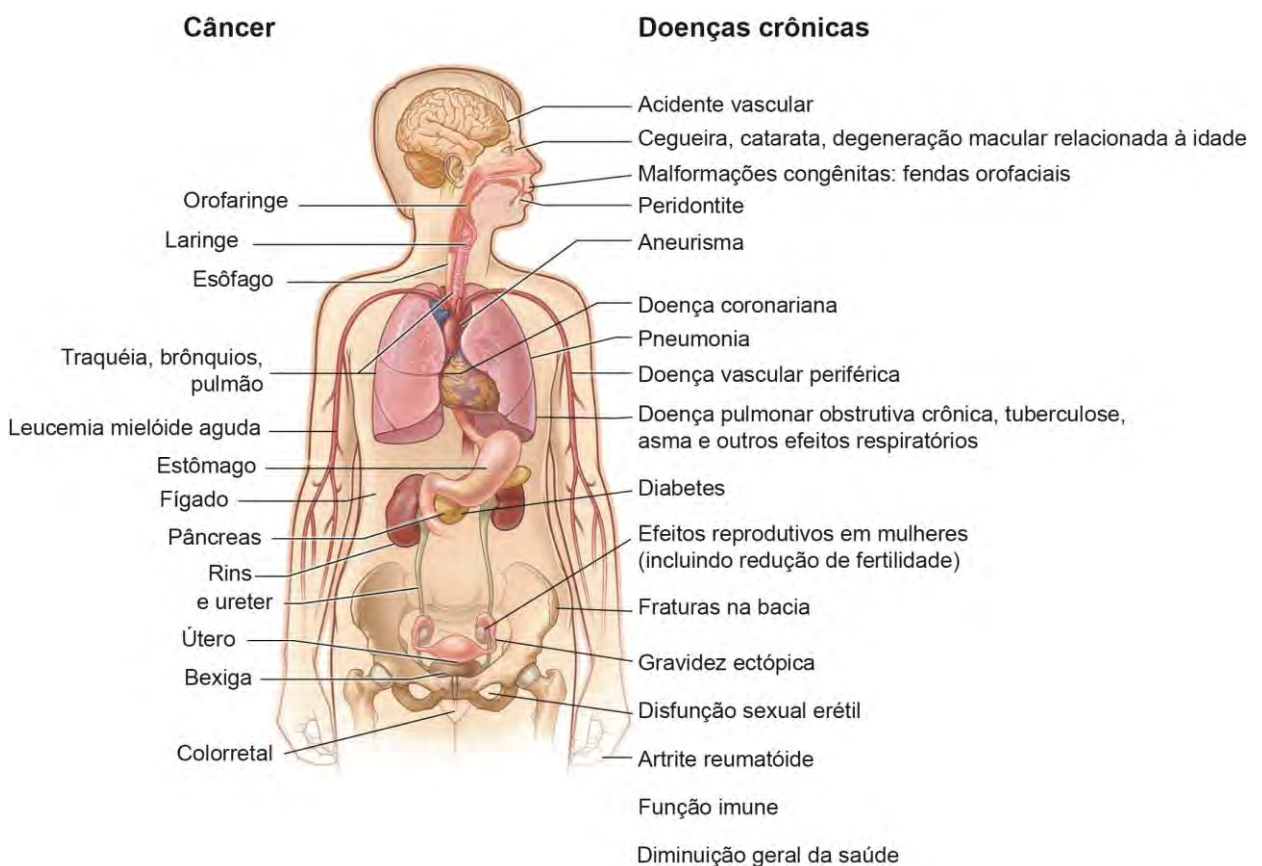


Figura 1. Doenças e consequências à saúde associadas ao tabagismo.

Fonte: Adaptado de NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH, 2014.

A literatura acumula evidências de que o fumo passivo, provocado pela inalação involuntária da fumaça de cigarro no ambiente, também está relacionado a diversos efeitos adversos à saúde (Figura 2). Além disso, não existe um nível seguro de exposição passiva à fumaça do tabaco. O tabagismo passivo causa mais de 1,2 milhão de mortes prematuras por ano no mundo e aumenta o risco de patologias como doença coronariana, câncer de pulmão e outras doenças respiratórias. Em crianças, está associado a doenças como no sistema respiratório, Síndrome da Morte Súbita Infantil e doença do ouvido médio (USDHHS, 2014).

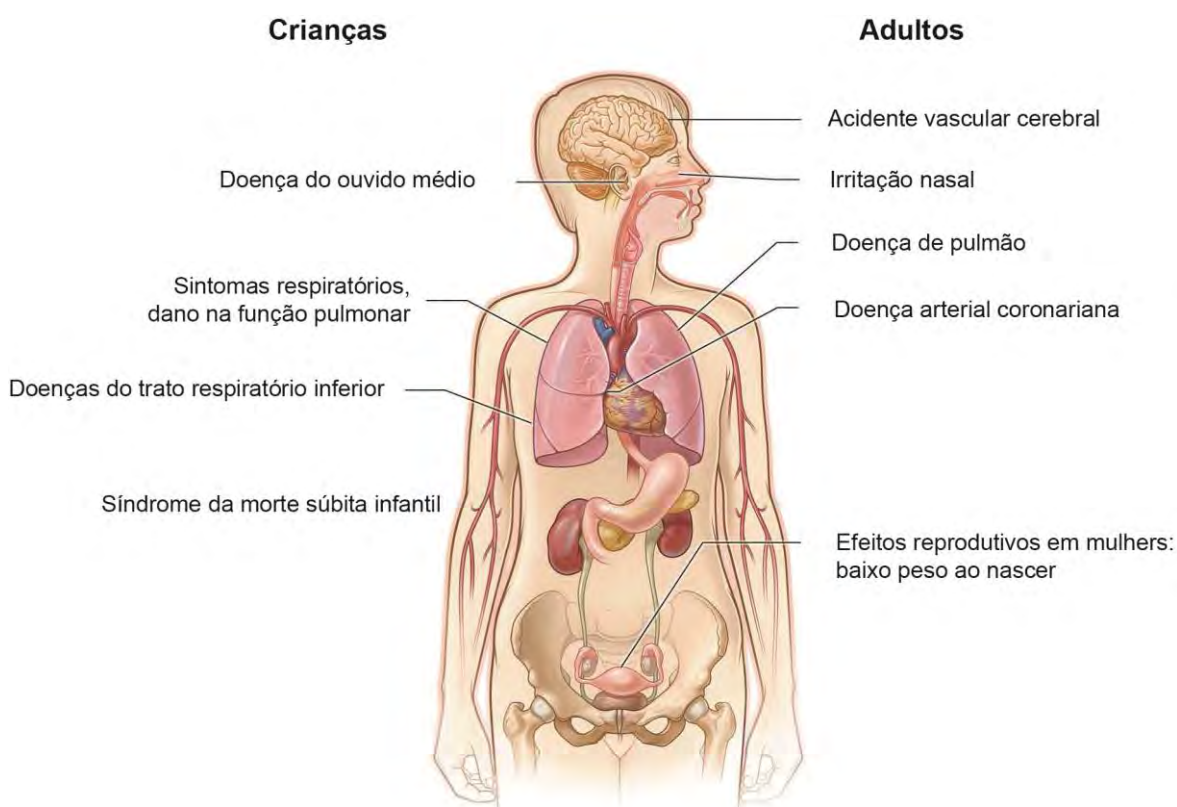


Figura 2. Doenças e consequências à saúde associadas ao tabagismo passivo.

Fonte: Adaptado de NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH, 2014.

A cada ano no Brasil, o tabagismo é responsável pela ocorrência de 1.103.421 eventos. Deste total, 43% correspondem ao infarto agudo do miocárdio e a outros eventos cardiovasculares, 34% à doença pulmonar obstrutiva crônica, 5% a acidente vascular cerebral e 4% a novos diagnósticos de câncer por ano. Além disso, durante o ano de 2015, o tabagismo

foi responsável por 156.216 mortes, o que significa 428 mortes ao dia. Este valor representa 12,6% do total das mortes que ocorrem no Brasil anualmente (PINTO et al., 2017). As Figuras 3 e 4 mostram as principais doenças e causas de mortalidade atribuíveis ao tabagismo e os números correspondentes de pessoas que adoecem por ano no Brasil.

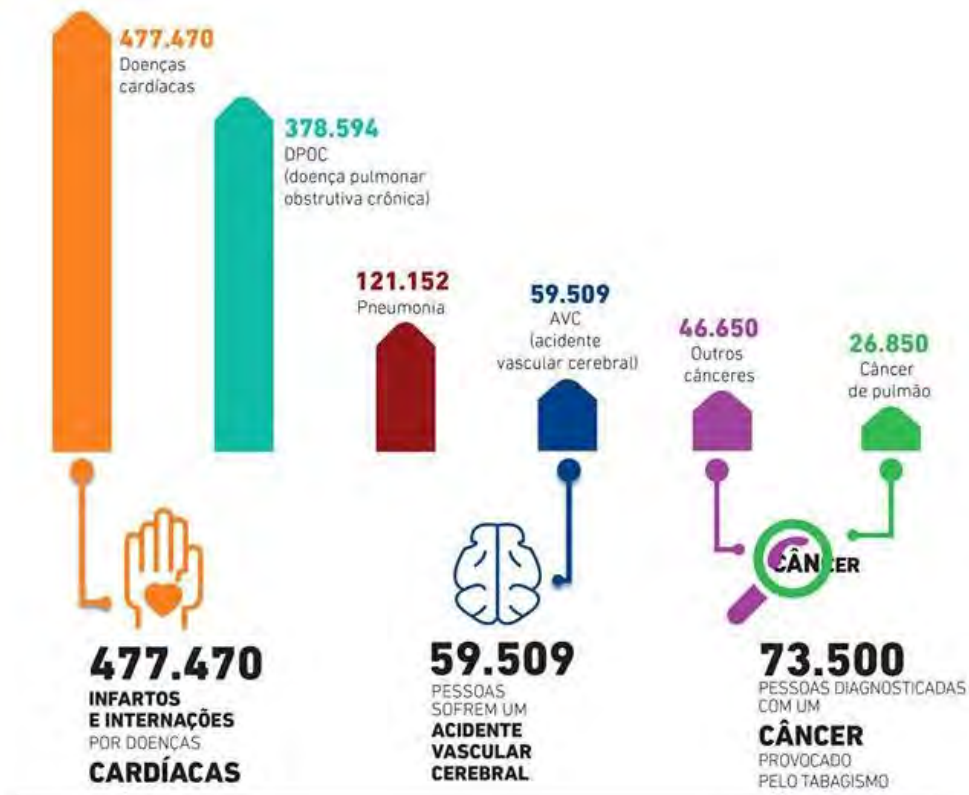


Figura 3: Principais doenças e respectivos números de doentes por causas atribuíveis ao tabagismo.

Fonte: Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2017), com dados de PINTO et al., 2017.

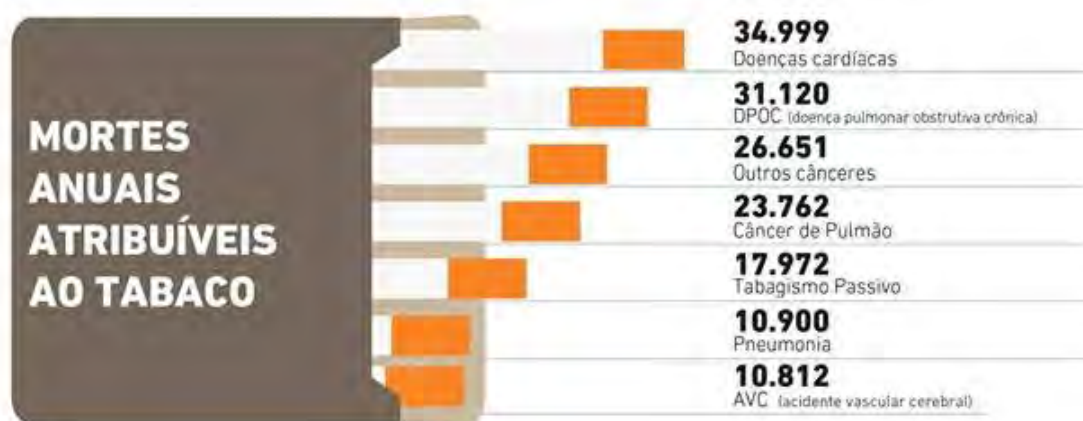


Figura 4: Mortes anuais atribuíveis ao tabagismo.

Fonte: INCA, 2017, com dados de PINTO et al., 2017.

2.3 CUSTOS RELACIONADOS AO TABAGISMO

Além do consumo de tabaco representar um alto gasto financeiro para as famílias, as doenças relacionadas ao tabagismo provocam incapacitação e perda de produtividade laboral, que podem retirar muitas pessoas do mercado de trabalho, influenciando negativamente os números da economia brasileira (INCA, 2017). Estima-se que os gastos relacionados com tratamentos de doenças provocadas pelo tabagismo representem de 6% a 15% dos custos anuais de tratamentos médico-hospitalares em países de alta renda (NUNES; CASTRO, 2010).

O Brasil tem um prejuízo anual estimado em R\$ 56,9 bilhões de reais com o tabagismo, ou 0,96% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional. Desse total, R\$ 39,4 bilhões são gastos com despesas médicas e R\$ 17,5 bilhões com custos indiretos ligados à perda de produtividade, causada por incapacitação de trabalhadores ou morte prematura. A arrecadação de impostos com a venda de cigarros no país é de R\$ 12,9 bilhões, o que gera saldo negativo de R\$ 44 bilhões por ano (PINTO et al., 2017). A figura 5 resume os custos totais com assistência médica e perda de produtividade.

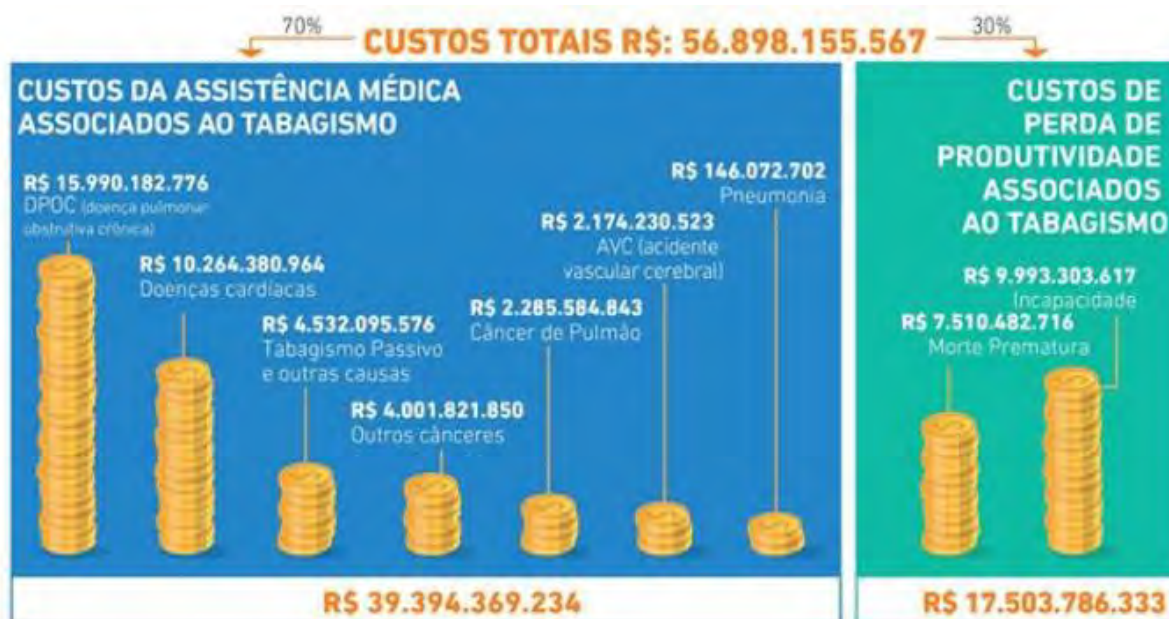


Figura 5: Custos totais com assistência médica e perda de produtividade associados ao tabagismo por ano no Brasil.

Fonte: Inca 2017, com dados de PINTO et al., 2017.

2.4 TERAPIAS DE CESSAÇÃO DO TABAGISMO

A constatação do papel psicoativo da nicotina, presente em todos os derivados do tabaco, faz com que o tabagismo esteja inserido, de acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à saúde (CID10), no grupo dos transtornos neurocomportamentais decorrentes do uso de substância psicoativa (ARAÚJO et al., 2012; INCA, 2007). O tabagismo também é visto como uma doença crônica cujo tratamento faz parte da rotina do Sistema Único de Saúde (SUS) (INCA, 2007).

Os estudos mostram, que no Brasil, a idade média para iniciação do consumo de tabaco é entre 15 e 16 anos, e a idade média para procura de tratamento de cessação é de 45 anos (NUNES, 2010). O tratamento de tabagismo no Brasil é realizado de acordo com as diretrizes do Programa Nacional de Controle do Tabagismo (PNCT), onde o Ministério da Saúde atualiza portarias referentes ao tratamento na rede SUS, visando a cessação e a prevenção da recaída. Atualmente, o modelo de tratamento adotado pelo país inclui avaliação clínica, abordagem mínima, básica ou intensiva, individual ou em grupo e, terapia medicamentosa (INCA, 2019; INCA, 2020b; MENDES et al., 2016).

Os medicamentos de primeira linha para o tratamento da dependência à nicotina utilizados no Brasil são a terapia de reposição de nicotina (TRN) por meio de adesivo transdérmico, goma de mascar e pastilha e o cloridrato de bupropiona, juntamente com a abordagem cognitivo-comportamental (Portaria Nº 761, DE 21 DE JUNHO DE 2016).

Além da reposição de nicotina e da administração de bupropiona, a vareniclina, medicamento especificamente desenvolvido para a cessação do tabagismo, também é considerada como tratamento farmacológico de primeira linha pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT) e tem sido usada desde 2006, quando foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), em vários países (ARAUJO et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2006; REICHERT et al., 2008). Outras drogas, como nortriptilina e clonidina são os fármacos considerados de segunda linha no tratamento (MARQUES et al., 2001; REICHERT et al., 2008).

Os métodos utilizados para a cessação do tabagismo são muito mais eficazes para algumas pessoas do que para outras (ARAUJO et al., 2012). Estudos mostram que aproximadamente 80% dos fumantes possuem o desejo de parar de fumar, mas apenas 35% conseguem cessar o hábito e 5% conseguem parar sem assistência (O'BRIEN, 2006). O tratamento de cessação pode se tornar mais custoso, devido a eventuais recaídas (ARAUJO et al., 2012), já que os dados mostram que existe um elevado percentual dos fumantes que desejam parar, e apenas uma parte tem sucesso no tratamento (KING et al., 2012; O'BRIEN, 2006).

A literatura mostra que a resposta às terapias farmacológicas de tratamento para cessação do tabagismo pode ser influenciada por diversos polimorfismos genéticos. Os diferentes genes são associados à variabilidade na resposta a tratamentos como vareniclina, bupropina e TRN, levando em conta o sucesso de cessação, recaídas, tempo e sintomas de abstinência (BERGEN et al., 2013; JOHNSTONE et al., 2007; MUNAFO et al., 2011; ZDANOWICZ, MM; ADAMS, PW, 2014). Estes tipos de estudos sugerem que marcadores genéticos podem ser úteis para a observação clínica e para a identificação do melhor tipo de tratamento (BERGEN et al., 2013; GAYA et al., 2018; KING et al., 2012), o que pode ser bastante promissor para o desenvolvimento de uma medicina personalizada de cessação.

2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CIGARRO

Todas as formas de consumo de tabaco são consideradas perigosas, e não existe nível de exposição seguro. O cigarro industrial é a forma mais comum de consumo de tabaco no mundo. Outros produtos de tabaco incluem narguilé, charutos, cigarrilhas, cigarro de palha, cachimbo e bidis (WHO, 2020).

Durante a queima dos produtos de tabaco, substâncias químicas que existem inicialmente no tabaco e novos compostos que são formados durante a combustão são liberados na fumaça do cigarro. Mais de 9000 substâncias já foram identificadas no cigarro, compreendendo uma combinação de gases, líquidos e partículas (RODGMAN & PERFETTI, 2013; USDHHS, 2014). Dentre estas, a nicotina é identificada como a principal substância responsável pelos efeitos geradores de dependência (ARINAMI; ISHIGURO; ONAIVI, 2000; KARNATH, 2002).

Algumas classes de compostos presentes no cigarro são óxidos de carbono e nitrogênio, aminas, imidas, lactamas, ácidos carboxílicos, lactonas, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, nitrosaminas, N-heterocíclicos, hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos monocíclicos e policíclicos aromáticos, nitrilos, anidridos, hidratos de carbono, éteres, compostos nitro e metais pesados, dentre eles, chumbo, cádmio, níquel, cromo, arsênio e berílio (IARC, 2012).

Pelo menos 250 substâncias presentes no cigarro são conhecidas por serem prejudiciais à saúde e ao menos 69 por causar câncer (USDHHS, 2014). A tabela 1 mostra algumas das diferentes classes químicas destes carcinógenos.

Alguns dos compostos classificados como carcinogênicos do Grupo I (comprovadamente carcinógeno para humanos) são o benzeno, benzo[a]pireno, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) e N'-nitrosonornicotina, 2-naftilamina, 4-aminobifenilo, formaldeído, 1,3-butadieno, cloreto de vinila, óxido de etileno, arsênio, berílio, compostos de níquel, cromo VI, cádmio e polônio-210. O benzeno está presente em cerca de 12 a 50 µg por cigarro e, juntamente com 1,3-butadieno (20–40 µg/cigarro), representam os dois principais carcinógenos presentes neste produto (IARC, 2012).

Tabela 1: Substâncias carcinógenas presentes no cigarro conforme a *International Agency for Research on Cancer* (IARC).

Substâncias carcinógenas presentes no cigarro		
Classe química	Número de carcinógenos	Substâncias carcinógenas
Hidrocarbonetos		
Policíclicos Aromáticos e seus análogos heterocíclicos	15	Benzo[a]pireno
N-nitrosaminas	8	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona N'-nitrosornicotina
Aminas aromáticas	12	4-aminobifenilo 2-naftilamina
Aldeídos	2	Formaldeído
Fenol	2	Catecol Ácido caféico
Hidrocarbonetos voláteis	3	Benzeno 1,3-butadieno
Outros orgânicos	12	Óxido de etileno
Compostos inorgânicos	8	Cádmio Polônio 210

Fonte: adaptado de IARC, 2012.

NOTA: Existem outros carcinógenos não apresentados na tabela.

2.6 BASE NEUROBIOLÓGICA DA ADICÇÃO

A nicotina é identificada como a principal substância responsável pelos efeitos geradores da dependência ao tabaco. Trata-se de um alcaloide constituído por um anel piridínico e um pirrolidínico (Figura 6). Sua forma de introdução no organismo é quase que exclusivamente a via inalatória, a partir da queima do tabaco (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009; LEWIS; MILLER; LEA, 2007).

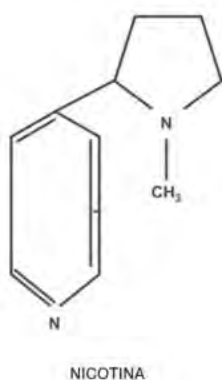


Figura 6: Representação da estrutura molecular da nicotina.

Fonte: adaptado de ROSEMBERG; INCA, 2007.

Uma vez inalada, a nicotina alcança os alvéolos pulmonares e é absorvida rapidamente pela corrente sanguínea. Em cerca de 10-60 segundos atravessa a barreira hematoencefálica, alcança o cérebro com uma concentração inicial de 100-500 nM, e rapidamente induz os efeitos neurológicos. A nicotina é metabolizada principalmente pelas enzimas citocromo P450A6 no fígado (CYP2A6) à cotinina, seu principal metabólito urinário. A CYP2A6 responde por aproximadamente 80% desta metabolização (BENOWITZ, 2010; HUKKANEN, 2005; PILIGUIAN et al., 2014).

Ao alcançar o cérebro, a nicotina ativa o sistema de recompensa cerebral mesolímbico, composto por neurônios dopaminérgicos que partem da área tegmental ventral e chegam, principalmente, ao núcleo accumbens. Outras regiões estão também envolvidas, como o córtex frontal, a amígdala e o tubérculo olfativo (CUNHA et al., 2007; LEWIS; MILLER; LEA, 2007; NESTLER, 2005) (Figura 6). O sistema mesolímbico é a principal estrutura neurobiológica associada à adicção ao tabaco. Está relacionado ao mecanismo de condicionamento ao uso da

nicotina, como a sensação de prazer, recompensa, euforia, excitação, diminuição da fadiga e relaxamento, exercendo, portanto, um papel crucial nos efeitos de reforço da droga (FORMIGONE et al., 2017; NESTLER, 2005; ZDANOWICZ; ADAMS, 2014).

Dentre os neurotransmissores liberados pela estimulação dos nAChRs pela nicotina (norepinefrina, acetilcolina, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato e endorfinas), o aumento de dopamina é o principal mecanismo de ativação do sistema de recompensa cerebral. Adicionalmente, a nicotina também induz o aumento da atividade excitatória glutamatérgica e, em exposição prolongada, a redução da atividade inibitória GABAérgica sobre a via mesolímbica, o que facilita ainda mais a liberação de dopamina (ARAUJO et al., 2012; BENOWITZ, 2010; ZDANOWICZ; ADAMS, 2014).

O mecanismo molecular da ativação do sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico tem início pela ligação da nicotina aos receptores nAChRs pré-sinápticos presentes na área tegmental ventral. Esta ligação promove uma mudança conformacional nos receptores levando a abertura dos canais catiônicos (Sódio- Na^+ , Potássio- K^+ , e cálcio- Ca^{2+}), o que provoca despolarização neuronal. O fluxo intracelular dos níveis de íons, principalmente o cálcio, é importante para ativação da cascata de eventos que irá resultar na liberação de neurotransmissores, principalmente da dopamina no núcleo accumbens (BENOWITZ, 2010; IMPROGO et al., 2010b; WONNACOTT; SIDHPURA; BALFOUR, 2005). Após o disparo neuronal, as vesículas contendo dopamina se fundem à membrana e liberam o neurotransmissor na fenda sináptica. A dopamina presente no espaço sináptico transmite o sinal pós-sinápticamente estimulando os receptores dopaminérgicos (DRDs). Existem alguns mecanismos que removem a dopamina sináptica e interrompem o sinal produzido pelo neurotransmissor. A maior parte da dopamina é recaptada pelos transportadores de dopamina (DAT) nos neurônios pré-sinápticos, que pode então ser estocada em vesículas para ser utilizada em futuras neurotransmissões ou pode ser degradada pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) (BATRA et al., 2003; LEWIS; MILLER; LEA, 2007). Além disso, existem receptores de dopamina pré-sinápticos (DRDs) que atuam como autoreceptores, que identificam o fluxo excessivo de dopamina e inibem sua síntese (HERMAN et al., 2014; MA et al., 2015a) (Figura 7).

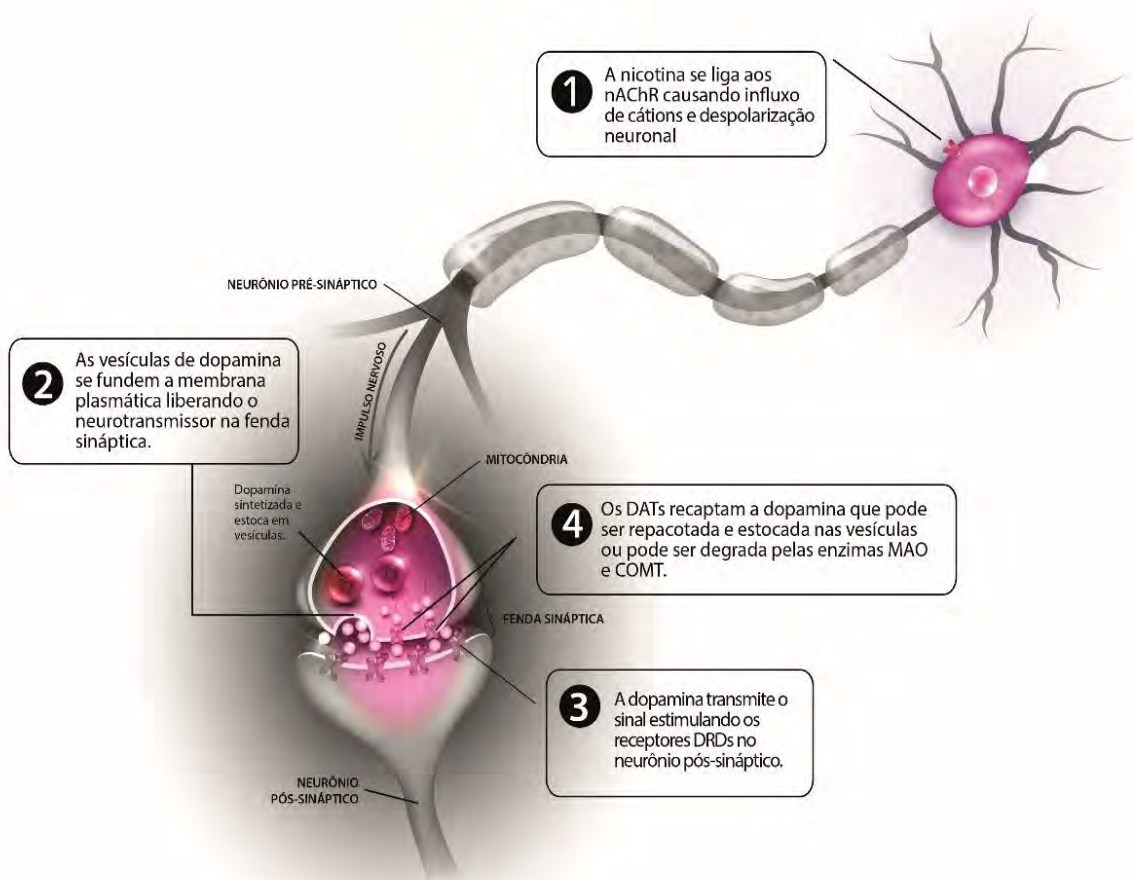


Figura 7: Representação do mecanismo de ativação do sistema de recompensa dopaminérgico pela nicotina. nAChRs: Receptores nicotínicos de acetilcolina; DRDs: Receptores de dopamina; DATs: Transportadores de dopamina; MAO: Monoaminoxidase; COMT: Catecol-O-metiltransferase. Fonte: da autora.

A manutenção da dependência está ligada a uma combinação dos seguintes fatores: 1) a sensação de recompensa pelo uso da droga; 2) o uso crônico de tabaco provoca uma neuroadaptação do sistema de recompensa mesolímbico que leva à tolerância, e requer maiores doses de nicotina para alcançar a sensação de bem-estar; e 3) na ausência da nicotina, uma série de sintomas de abstinência são desencadeados (irritabilidade, ansiedade, estresse, desatenção, depressão e insônia) que provocam a necessidade de sua readministração para evitar os sintomas negativos (FORMIGONE et al., 2017; ZDANOWICZ; ADAMS, 2014).

Ainda não foram elucidados todos os mecanismos ligados à dependência nicotínica. Acredita-se que indivíduos que têm menor disponibilidade de dopamina possuem maior necessidade de estimular sua liberação com substâncias exógenas, como a nicotina. Dessa forma, indivíduos com tal característica fumam em maior quantidade, tendem a iniciar o

tabagismo mais cedo e têm maior dificuldade de abandonar o tabaco em comparação com indivíduos que possuem maior disponibilidade de dopamina (CHATKIN, 2006; SABOL et al., 1999; MOURA, 2016).

2.7 DETERMINANTES GENÉTICOS DO TABAGISMO

Pesquisas mostram que o comportamento do tabagismo é complexo e multifatorial, influenciado por fatores genéticos e ambientais (MUNAFÒ et al., 2004; SULLIVAN; KENDLER, 1999). Entre as variáveis que influenciam no risco para o tabagismo estão: os estímulos provenientes da publicidade, a facilidade de aquisição da droga pelos baixos preços dos cigarros e aceitação social (KIRCHENCHTEJN; CHATKIN, 2004), exemplo dos pais e de líderes fumantes (JIN et al., 2006), e fatores sociodemográficos como idade, gênero, etnia e nível educacional (USDHHS, 2012). O uso de álcool e presença de doenças psiquiátricas, como depressão, também podem ser relacionadas ao consumo de produtos de tabaco (CASTRO et al., 2008; MALBERGIER; OLIVEIRA, JR, 2005; SHARMA et al., 2015).

Além das características ambientais, estudos apontam a hereditariedade como um forte componente para o uso do cigarro e mostram como as diferenças interindividuais podem interferir na forma como o indivíduo responde aos estímulos ambientais. Estudos com gêmeos identificaram a influência dos fatores genéticos na dependência nicotínica (BERRETTINI et al., 2008; DUCCI; GOLDMAN, 2012; HALL; MADDEN; LYNSKEY, 2002; MUNAFÒ et al., 2004), onde a hereditariedade estimada é de, pelo menos, 50% (HARDIE; MOSS; LYNCH, 2006; LESSOV-SCHLAGGAR et al., 2006; MAES et al., 2004; XIAN et al., 2003) e as taxas de persistência do tabagismo e de cessação são mais altas em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos (CARMELLI et al., 1992). Por exemplo, uma pesquisa desenvolvida com 2204 gêmeos monozigóticos e 1793 gêmeos dizigóticos vietnamitas observou que os fatores genéticos são responsáveis por 50% da variância no risco para iniciação e 70% do risco da persistência do ato de fumar (TRUE et al., 1997). Além disso, estudos com indivíduos adotivos também contribuem para o entendimento do papel da genética para a adicção ao tabagismo (HALL; MADDEN; LYNSKEY, 2002). A literatura sugere que variações genéticas podem influenciar alguns aspectos do comportamento tabágico: 40-75% para a iniciação, 70-80% para a persistência e mais de 50% para o sucesso de cessação (HEATH et al., 1995; MUNAFÒ et al., 2004; TRUE et al., 1997).

Os estudos realizados no sentido de investigar genes que possam estar envolvidos com o tabagismo, se concentram principalmente naqueles que podem influenciar na resposta à nicotina, interferindo em seu metabolismo ou nos receptores e, também, nos genes relacionados ao fluxo de neurotransmissores no sistema de recompensa no cérebro (ARINAMI; ISHIGURO; ONAIVI, 2000; HO; TYNDALE, 2007; MUNAFÒ et al., 2004).

O primeiro grupo de genes candidatos que está relacionado à resposta nicotínica, avalia, principalmente, os genes relacionados ao metabolismo (*CYP*) e os genes dos receptores de nicotina (*CHRN*) (CHATKIN, 2006; GREENBAUM; LERER, 2009) (LI; MA; BEUTEN, 2004). Isto se deve ao fato de os efeitos farmacológicos do tabaco serem produzidos principalmente pela nicotina (HUKKANEN, 2005; USDHHS, 2014).

O segundo grupo de genes candidatos está relacionado ao fluxo de dopamina. Isso se deve principalmente ao papel do sistema mesolímbico dopaminérgico para os efeitos de recompensa (BATRA et al., 2003; QUAAK et al., 2009). Os estudos focam em genes que codificam os receptores (*DRD/ANKKI*) e transportadores de dopamina (*DAT*), síntese (*TH*) e metabolismo (*DBH; COMT; MAO*), que modulam a concentração de dopamina na fenda sináptica (MA et al., 2015b).

2.8 POLIMORFISMOS NOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

Os genes que codificam os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) estão sendo amplamente estudados nos últimos anos como candidatos para a suscetibilidade ao tabagismo devido à relevância biológica dos sítios de ligação para nicotina. Como citado anteriormente, a nicotina se liga aos nAChRs presentes no sistema dopaminérgico e leva a uma mudança conformacional que abre o canal catiônico, causando influxo de íons, principalmente de Ca^{2+} . A passagem de íons provoca despolarização neuronal e a liberação de dopamina na fenda sináptica (Figura 8). Este aumento da transmissão da dopamina, que conseqüentemente ativa os mecanismos de recompensa, é crucial para o desenvolvimento da dependência. Sendo assim, os efeitos da nicotina no sistema nervoso são dependentes destes receptores, e variações que alteram a função das subunidades dos nAChRs podem influenciar na dependência (KITAMILCZARSKA; SIEMINSKA; JASSEM, 2016; PEDNEAULT et al., 2014).

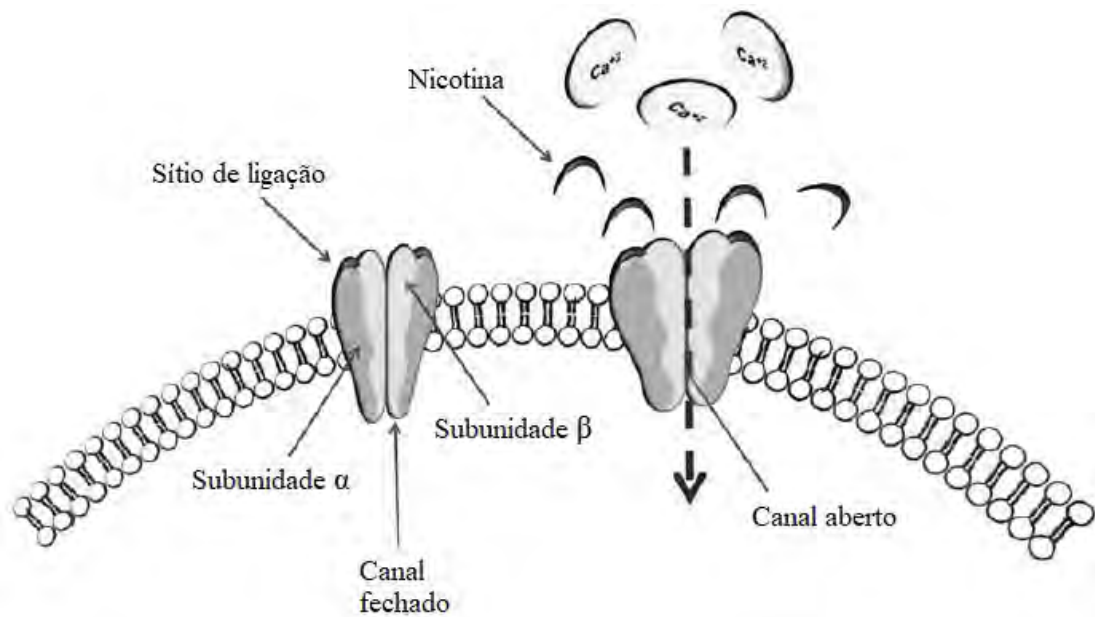


Figura 8. Representação da ligação da nicotina aos nAChRs.

A ligação da nicotina ao nAChR provoca uma alteração conformacional e abertura do canal catiônico e, conseqüentemente, o influxo de íons e despolarização neuronal, que por sua vez promove a liberação de dopamina. Fonte: adaptado de Russo et al., 2011.

Os nAChRs são proteínas formadas por cinco subunidades pentaméricas distribuídas em torno de um poro central. As subunidades e os receptores formados por elas possuem duas classes, neuronal e neuromuscular (BUCZKOWSKI et al., 2015; SACCONI et al., 2009). Em humanos, em contraste com os receptores neuromusculares, que são compostos por subunidades α , β , γ , δ , e ϵ , os nAChRs neuronais são formados apenas por subunidades α e β . São observadas nove subunidades α ($\alpha 2$ – $\alpha 10$; mas a $\alpha 8$ não é detectada em mamíferos, apenas em aves) e três subunidades β ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) (GREENBAUM; LERER, 2009; IMPROGO et al., 2010a, 2013; SACCONI et al., 2009; WEN et al., 2016). As subunidades se organizam em diferentes combinações, resultando em vários subtipos de nAChR, que diferem na distribuição no corpo e nas funções biológicas (IMPROGO et al., 2010a; WARE; VAN DEN BREE; MUNAFO, 2011; WEN et al., 2016). Os receptores do tipo neuronal podem ser homopentâmeros, compostos apenas por subunidades α ou β , ou heteropentâmeros, compostos pela combinação de subunidades α e β (GREENBAUM; LERER, 2009; SACCONI et al., 2009) (Figura 9).

As subunidades são formadas por um domínio amino-terminal (N), quatro segmentos transmembranas (M1-M4), uma alça citoplasmática de comprimento variável entre o terceiro e quarto domínio transmembrana, e um domínio carboxi-terminal (C) (Figura 9). Os domínios transmembrana e N-terminal são conservados entre as diferentes subunidades, enquanto a alça citoplasmática é variável em comprimento e composição dos aminoácidos. Cada uma das subunidades é codificada por um gene “Receptor nicotínico colinérgico” (*CHRN*) (IMPROGO et al., 2010a; ZOLI et al., 2018).

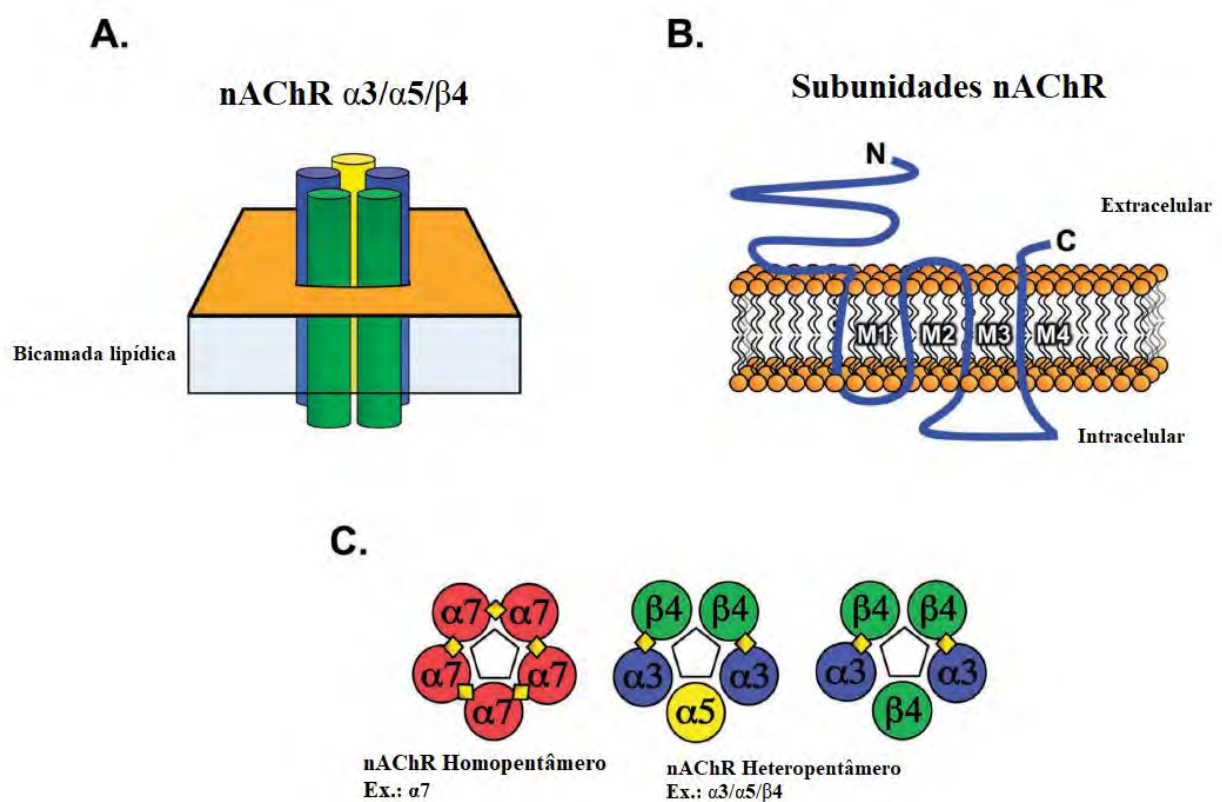


Figura 9: Representação da estrutura dos nAChRs.

A) Representação esquemática ilustrando o arranjo pentamérico das subunidades de nAChR. B) Subunidade de nAChR incluindo os terminais amino (N) e carboxi (C), segmentos transmembrana (M1-M4), e a alça intracelular. C) Subunidades individuais nAChR são representadas por círculos coloridos. Os losangos amarelos representam os sítios de ligação. Os pentágonos no centro dos pentâmeros representam a região do poro. Fonte: adaptado de IMPROGO et al., 2010a.

Recentemente, muitas pesquisas relacionadas ao comportamento do tabagismo envolvendo estudos de genes candidatos (do inglês “*candidate gene study*”) e de associação genômica ampla (do inglês “*Genome-wide studies*”) têm voltado a atenção para um *cluster* genômico composto por três membros da família dos nAChR - $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$, cujos genes são denominados *CHRNA5/A3/B4* (GREENBAUM; LERER, 2009; IMPROGO et al., 2010b). As subunidades $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$ são altamente expressas no sistema nervoso periférico, assim como em diversas regiões cerebrais como tálamo, cerebelo, hipocampo, núcleo interpeduncular, amígdala e outras áreas de grande importância para o mecanismo de adicção à nicotina, como habênula medial, área tegmental ventral e núcleo accumbens (IMPROGO et al., 2010b; WARE; VAN DEN BREE; MUNAFO, 2011; ZUO et al., 2016). Klink e colaboradores (2001) observaram em seu estudo com ratos que as subunidades $\alpha 5$ e $\alpha 3$ eram expressas em altas proporções nos neurônios dopaminérgicos: $\alpha 5$ era expressa em 80% dos neurônios e, $\alpha 3$ em 60%. Além disso, estas subunidades tinham uma grande amplitude na área tegmental ventral.

Os genes *CHRNA5/A3/B4* são localizados na região cromossomial 15q24–25. A subunidade $\alpha 3$ em combinação com a subunidade $\beta 4$ formam um receptor funcional, enquanto $\alpha 5$ funciona como uma subunidade auxiliar, cuja incorporação modifica a permeabilidade do cálcio no receptor e a sua afinidade e dessensibilização por agonistas (IMPROGO et al., 2010a; ZOLI et al., 2018).

Alguns polimorfismos na região *CHRNA5/A3/B4* têm sido estudados em relação ao tabagismo (Figura 10), entre eles o polimorfismo rs16969968. O rs16969968 é um polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) e trata-se de uma variação não sinônima no quinto éxon do gene *CHRNA5*. A mudança de guanina por adenina ($G > A$) causa, conseqüentemente, uma mudança no aminoácido de ácido aspártico (Asp) para asparagina (Asn), na posição 398 na subunidade 5 da proteína (D398N) (BUCZKOWSKI et al., 2015; SACCONI et al., 2007; VERDE et al., 2011; WARE; VAN DEN BREE; MUNAFO, 2011; WEN et al., 2016).

Estudos *in vitro* mostram que esta alteração de aminoácidos na proteína provoca uma mudança funcional no receptor (BIERUT et al., 2008; TAMMIMÄKI et al., 2012), onde receptores *CHRNA5* com ácido aspártico apresentam uma melhor resposta ao agonista do que a variação com o aminoácido asparagina (GEORGE ET AL., 2012). Desta forma, receptores que expressam asparagina apresentam menor resposta a nicotina, causando menor permeabilidade de íons de cálcio e seu menor nível intracelular (KURYATOV et al., 2010; TAMMIMKAVI et al., 2012), levando a uma diminuição da sensibilidade às propriedades de

recompensa da nicotina (BRUNZEL et al., 2015). Estes dados sugerem que a redução da capacidade de ligação à nicotina resulta na necessidade de aumentar a ingestão de nicotina e, como um efeito, o desenvolvimento da dependência à substância (BRUNZEL et al., 2015; BUCZKOWSKI et al., 2015; WARE et al., 2011). O alelo *A*, cuja presença determina a mudança de ácido aspártico para a substituição asparagina, é considerado o alelo de risco para o tabagismo em comparação ao alelo *G* (BUCZKOWSKI et al., 2015; BÜHLER et al., 2015). Trabalhos mostram que indivíduos com duas cópias do alelo *A* apresentam um risco aumentado de quase duas vezes para dependência nicotínica do que indivíduos com outros genótipos (*AG/GG*) (SACCONI et al., 2007; GREENBAUM et al., 2009).

Alguns polimorfismos no gene *CHRNA3* também têm sido estudados em relação ao tabagismo. Entre eles, o rs578776 que é encontrado na região 3'UTR do gene *CHRNA3*, que consiste em um *SNP* de substituição de citosina (*C*) por timina (*T*) (BUCZKOWSKI et al., 2015; IMPROGO et al., 2010a). A maior parte dos estudos mostra que o alelo *T* do polimorfismo rs578776 confere um efeito protetor para a dependência nicotínica (STEPHENS et al., 2013). Estudos relatam que este alelo também está associado ao consumo de um menor número de cigarros por dia (BUCZKOWSKI et al., 2015). O mecanismo molecular para a explicação do efeito protetor do polimorfismo rs578776 ainda não foi elucidado. Alguns estudos sugerem que a região pode conter sequências regulatórias, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a real função da variante (BIERUT, 2009; CONLON; BEWICK, 2011; CHUNG et al., 2019).

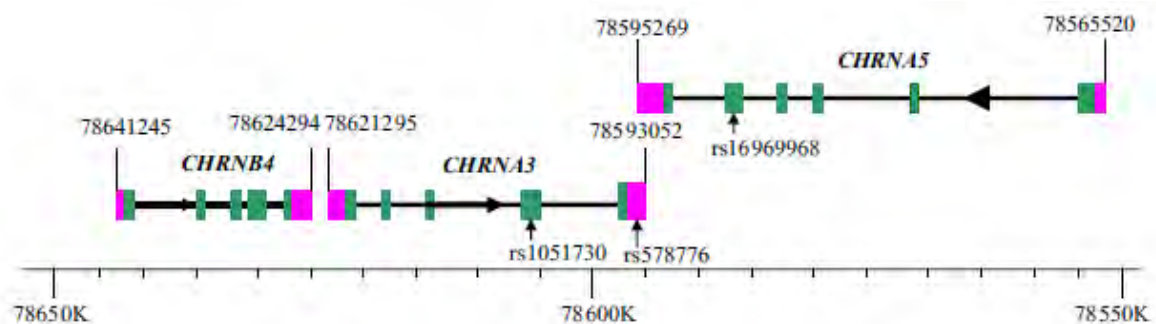


Figura10. Polimorfismos rs578776 e rs16969968 no *cluster CHRNA5/A3/B4*.

Diagrama esquemático do *cluster CHRNA5/A3/B4*. As setas horizontais pretas indicam a direção da transcrição de cada gene. Os retângulos verdes e rosas indicam, respectivamente, os exons e as regiões não traduzidas. As linhas horizontais pretas representam os introns. Os locais das variações polimórficas rs16969968 e rs578776 estão indicados por setas verticais. Fonte: Adaptado de WEN et al., 2016.

2.9 POLIMORFISMO RELACIONADO AO RECEPTOR DE DOPAMINA

Variantes dos genes relacionados aos receptores de dopamina têm sido estudados devido ao papel do sistema dopaminérgico na dependência de substâncias de abuso (CLAGUE et al., 2010; MA et al., 2015a).

Os receptores de dopamina são proteínas acopladas a uma proteína G. São conhecidas duas classes de receptores de dopamina com 5 proteínas receptoras diferentes. A classe D1 contém os receptores de dopamina do tipo D1 e D5, enquanto a classe D2 contém os receptores do tipo D2, D3 e D4; e cada um dos cinco tipos é codificado por um gene distinto. Estes receptores são formados por sete domínios transmembrana. A família do receptor D1 apresenta uma longa cauda C-terminal e uma alça citoplasmática curta entre as hélices 5 e 6 transmembrana, enquanto a família do receptor D2 apresenta uma cauda C-terminal curta e uma longa alça citoplasmática entre as hélices 5 e 6 (Figura 11) (DE MEI et al., 2009; GOLAN, 2009).

Ambos os receptores D1 e D2 estão presentes no núcleo caudado e putâmen (o estriado), no núcleo accumbens, na tonsila do cerebelo, no tubérculo olfatório e no hipocampo. Os receptores D1 também estão presentes no córtex cerebral, enquanto os receptores D2 são encontrados na substância nigra, na área tegmental ventral e no hipocampo (GOLAN, 2009).

Os receptores de dopamina se expressam preferencialmente a nível pós-sináptico, entretanto, os receptores D2 também são expressos nos neurônios pré-sinápticos. Além disso, existem duas formas alternativas da proteína D2, D2 curta (D2S) e D2 longa (D2L), decorrentes de variantes de junção alternativas do mesmo gene (perda do éxon 6 em D2S). A diferença entre as isoformas está na terceira alça citoplasmática, que afeta a interação com a proteína G, mas não a ligação à dopamina (GOLAN, 2009; MA et al., 2015a). A isoforma D2L é expressa pós-sinápticamente, enquanto a D2S é observada nos neurônios pré-sinápticos (DE MEI et al., 2009; MA et al., 2015a).

Os receptores de dopamina também são classificados de acordo com seus efeitos sobre a formação do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) (ESTEVINHO et al., 2003; DE MEI et al., 2009). Os receptores D1 são acoplados a uma proteína Gs (proteína G estimulatória) que ativa a adenilciclase levando ao aumento dos níveis intracelulares do AMPc; enquanto os receptores D2 são acoplados a uma proteína Gi (proteína G inibitória), inibem a adenilciclase e reduzem a formação do AMPc. A adenil ciclase promove a formação do AMPc pela hidrólise

do (ATP), e o AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), amplificando a cascata de sinalização (DE MEI et al., 2009; MOURA et al., 2011; MA et al., 2015a). Desta forma, os receptores D1 e D2 exercem efeitos intracelulares opostos. A ativação de D1 é excitatória, enquanto D2 é inibitória (GOLAN 2009; RON; JURD, 2005) (Figura 11). Além da via da adenilciclase, os receptores dopaminérgicos podem também interagir com outras vias de transdução do sinal; os receptores do tipo D1 modulam os níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) por uma grande variedade de mecanismos, enquanto a estimulação dos receptores D2 aumentam a saída de potássio (K^+) da célula e reduzem o influxo de cálcio via canais dependente de voltagem (ESTEVINHO, et al., 2003; LEPSCH, 2008; GOLAN, 2009) (Figura 12).

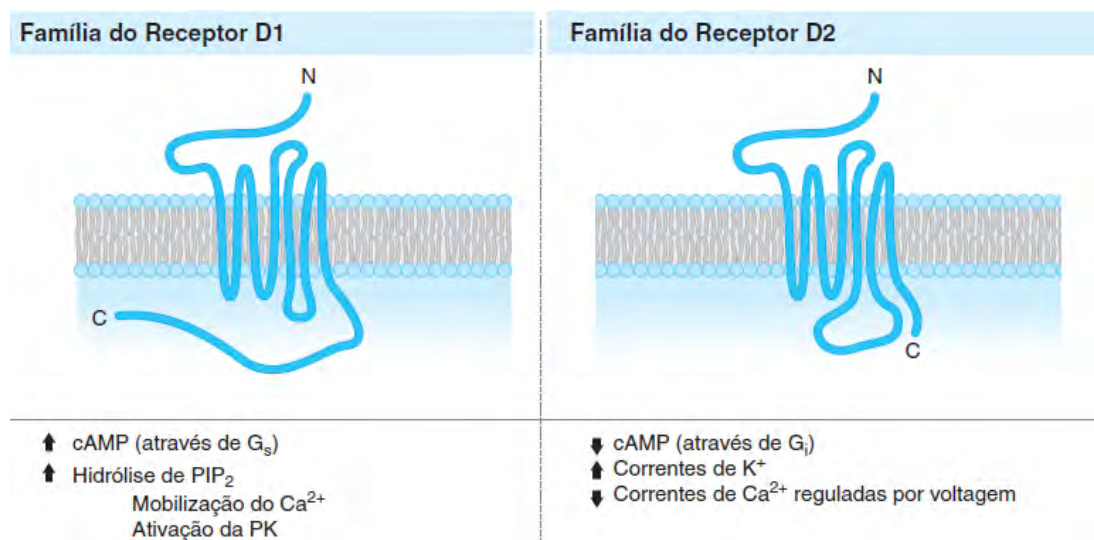


Figura 11. Representação das famílias de receptores de dopamina.

A família do receptor D1 apresenta uma longa cauda C-terminal e uma alça citoplasmática curta entre as hélices 5 e 6 transmembrana, enquanto a família do receptor D2 apresenta uma cauda C-terminal curta e uma longa alça citoplasmática entre as hélices 5 e 6. A estimulação da família D1 é excitatória, aumentando os níveis de AMPc e de Ca^{2+} intracelular e ativando a proteína quinase. A estimulação da família D2 é inibitória, diminuindo os níveis de AMPc e de Ca^{2+} intracelular e hiperpolarizando a célula. Fonte: adaptado de GOLAN, 2009.

Adicionalmente, os receptores de dopamina D2 pré-sinápticos atuam como autoreceptores. Esses autoreceptores identificam o fluxo excessivo de dopamina na sinapse e reduzem o tônus dopaminérgico, diminuindo a síntese de dopamina no neurônio pré-sináptico,

a taxa de descarga neuronal e a liberação do neurotransmissor. A inibição da síntese de dopamina ocorre devido a diminuição da atividade da tirosina hidroxilase dependente do AMPc (TH; uma enzima fundamental na síntese de catecolaminas); a inibição da descarga neuronal e da liberação de dopamina na sinapse deve-se a um mecanismo distinto que envolve a modulação dos canais de K^+ e de Ca^{2+} . A abertura dos canais de K^+ provoca a hiperpolarização do neurônio, sendo necessária uma maior despolarização para alcançar o limiar de descarga, enquanto a abertura dos canais de Ca^{2+} resulta em níveis diminuídos de Ca^{2+} intracelular. Como o Ca^{2+} é importante para que a vesícula sináptica se desloque e, também para que ocorra a fusão das vesículas com a membrana plasmática, a diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} resulta em liberação diminuída de dopamina (GOLAN, 2009).

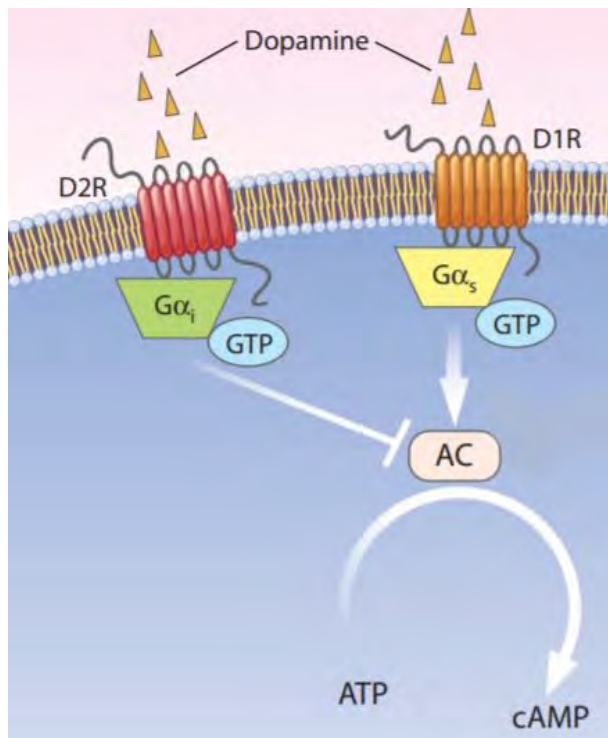


Figura 12: Representação da cascata de sinalização da dopamina.

A dopamina liberada na fenda sináptica pode interagir com seus receptores D1, acoplados à proteína Gs (estimulatória), ativando a formação do AMPc e a atividade da PKA; ou interagir com os receptores D2, acoplados a proteína Gi, que inibe a formação do AMPc. Fonte: adaptado de RON; JURD, 2005.

Entre os estudos que avaliam a relação entre os diferentes subtipos dos receptores de dopamina, o gene *DRD2*, localizado no cromossomo 11, tem recebido bastante atenção em relação ao tabagismo (BIDWELL et al., 2015; MA et al., 2015c; OHMOTO et al., 2014). Alguns polimorfismos nesse gene têm sido identificados. O mais estudado é um polimorfismo funcional do tipo *SNP* denominado *TaqIA* (rs1800497), que consiste em uma mudança de citosina para timina ($C>T$) (BIDWELL et al., 2015; MA et al., 2015c; OHMOTO et al., 2014). Este polimorfismo foi inicialmente considerado oriundo de uma mutação silenciosa, localizada 10 Kilobases (Kb) *downstream* do gene *DRD2*. Porém, foi descoberto recentemente que, na verdade, o *SNP* localiza-se no éxon 8 do gene *ANKK1* (*Repeat and kinase domain containing 1*), situado na região *forward* vizinha do *DRD2* (NEVILLE; JOHNSTONE; WALTON, 2004) (Figura 13). Este polimorfismo determina a substituição de glutamato por lisina (Glu713Lys) dentro da 11ª repetição de anquirina, que embora seja pouco provável que afete a integridade estrutural da proteína, pode afetar sua especificidade de ligação ao substrato (MOTA et al., 2012; NEVILLE; JOHNSTONE; WALTON, 2004).

Estudos *in silico* (ou seja, desenvolvidos por meio de simulação computacional) revelaram uma forte relação entre os genes *ANKK1* e *DRD2*. O *ANKK1* é adjacente ao gene *DRD2* e estes genes compartilham blocos de haplótipos e seus promotores têm elementos cis em comum para a regulação da transcrição. Além disso, o polimorfismo *TaqIA* (rs1800497) está em desequilíbrio de ligação com variantes polimórficos do *DRD2* que regulam a expressão de isoformas de D2 longas e curtas, e modulam a distribuição D2R cerebral (KOENEKE et al., 2020; MA et al., 2015c).

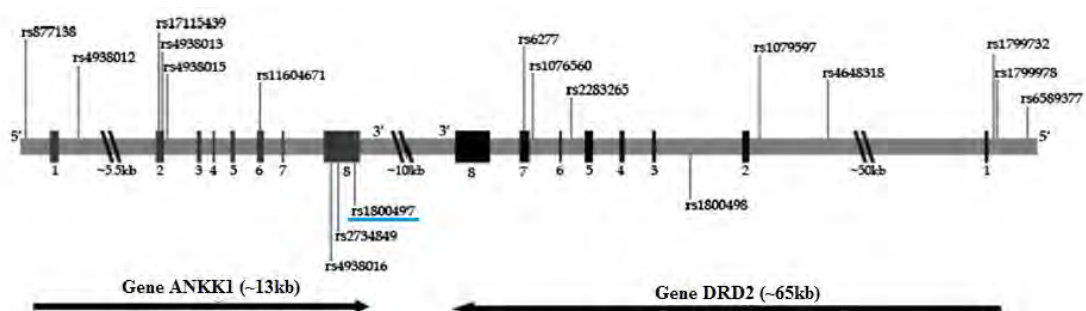


Figura 13: Localização de *SNPs* nos genes *ANKK1* e *DRD2*.

Fonte: adaptado de MA et al., 2015. Exons ou 3' e 5'-UTR para *DRD2* são representados pelas barras pretas, exons para *ANKK1* por finas barras pretas e os introns para *ANKK1/DRD2* pela linha cinza horizontal.

Estudos mostram que o alelo variante *T* do polimorfismo *TaqIA* (ou alelo *AI*) está relacionado com a alteração da função de D2 pela redução da densidade do receptor e de sua afinidade de ligação. Esta variação influencia, portanto, nas concentrações de dopamina sináptica (MA et al., 2015a; NEVILLE; JOHNSTONE; WALTON, 2004; THOMPSON et al., 1997).

O mecanismo molecular pelo qual *TaqIA* exerce efeito sobre o comportamento do tabagismo ainda não é elucidado, mas considerando que este polimorfismo interfere no sistema dopaminérgico, há necessidade de maiores estudos para compreensão de seus efeitos no cérebro (MA et al., 2015a). A hipótese mais difundida é de que pessoas portadoras do alelo *T*, ou seja, com um número reduzido de sítios de ligação para dopamina no cérebro, teriam um déficit no sistema de recompensa e assim experimentariam uma menor recompensa quando expostos a agentes dopaminérgicos. Estas pessoas precisariam usar maiores quantidades de nicotina para aumentar a concentração de dopamina sináptica, tornando-se, assim, mais rapidamente tolerante à substância e tendo um maior risco de dependência de nicotina (CLAGUE et al., 2010; MA et al., 2015a; ZLOMUZICA et al., 2018).

Entretanto, poucos estudos consideraram o efeito inibitório do receptor D2 e seu papel como autoreceptor, que limita a taxa de síntese e liberação da dopamina. Como o alelo variante *T* está relacionado a função reduzida do receptor, portadores do alelo *T* teriam uma menor inibição da síntese e liberação do neurotransmissor. Consequentemente, teriam maiores concentrações de dopamina sináptica, em comparação aos portadores do alelo selvagem. Desta forma, indivíduos portadores do alelo *T* do *TaqIA* teriam menor necessidade da repetição da estimulação dopaminérgica do que indivíduos que não apresentam a variação polimórfica e seriam, portanto, menos susceptíveis à adicção à nicotina (BIDWELL, et al., 2015; MOURA, 2016).

TaqIA rs1800497 tem sido associado a diversas desordens de comportamentos, como impulsividade, transtornos por uso de álcool e por outras drogas de abuso, obesidade, e transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (WHITE et al., 2008).

Algumas características do comportamento tabágico têm sido analisadas, em diversos grupos étnicos, dentre elas a idade de iniciação, o grau de dependência e o número de cigarros consumidos, os períodos de abstinência e as tentativas de cessação do hábito de fumar (BATRA et al., 2000; CLAGUE et al., 2010; DE RUYCK et al., 2010; GORDIEV et al., 2013; HUANG

et al., 2015; JOHNSTONE et al., 2004; RADWAN et al., 2007). Entretanto, a relação entre *TaqIA* rs1800497 e o tabagismo é controversa e os estudos mostram a influência étnica nesta relação (OHMOTO et al., 2013). Por exemplo, estudos com Caucasianos observaram que o alelo *T* estava associado ao aumento do risco de se tornar fumante (COMINGS et al., 1997; MORTON et al., 2006; NOBLE et al., 1994; OHMOTO et al., 2013), enquanto pesquisas com Japoneses, Poloneses e Russos mostraram um maior risco para o genótipo *CC* (GORDIEV et al., 2013; HAMAJIMA et al., 2002; OHMOTO et al., 2013; SIEMINSKA et al., 2009; YOSHIDA et al., 2001). Na população brasileira, que tem um perfil genético heterogêneo devido à grande miscigenação étnica (LINS et al., 2009), os trabalhos ainda são escassos (MOURA, 2016; TOMAZ et al., 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Uma vez que a dopamina desempenha um significativo papel na rota da dependência tabágica, polimorfismos em genes relacionados com o neurotransmissor devem ser investigados na busca das bases moleculares associadas à suscetibilidade ao tabagismo. Dentre eles, variações em genes relacionados aos receptores de nicotina e de dopamina são considerados alvos moleculares potenciais no estudo do comportamento da adicção, tais como polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNB5* e *TaqIA*.

O tabagismo é um comportamento complexo determinado por fatores ambientais e genéticos. Neste sentido, as pesquisas envolvendo a variabilidade genética têm avançado para a compreensão dos mecanismos de adicção, e podem ajudar a entender por que algumas pessoas desenvolvem o vício e outras não, além do entendimento em relação à diferença individual no grau de dependência e no sucesso de cessação.

Assim, um melhor entendimento dos mecanismos genéticos que conferem risco e proteção ao tabagismo poderia levar a estratégias mais efetivas de prevenção e controle e, ainda, contribuir para proposição de intervenções para cessação mais eficazes. Além disso, contribui para a diminuição do número de fumantes pelo mundo e, conseqüentemente, das doenças e custos relacionados.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968, *CHRNA3* rs578776 e *TaqIA* rs1800497 no comportamento do tabagismo em uma amostra populacional brasileira.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão integrativa envolvendo estudos que abordam os principais genes relacionados à via de recompensa cerebral dopaminérgica e seus efeitos no comportamento tabágico;
- Descrever as características do comportamento tabágico e sociodemográficas de uma amostra populacional de Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 e *TaqIA* rs1800497 na população do estudo;
- Investigar uma possível associação entre os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 e *TaqIA* rs1800497 e o *status* tabágico na população do estudo;
- Investigar uma possível relação entre os polimorfismos estudados com características do comportamento tabágico, como a idade de iniciação, quantidade de cigarros consumidos, o grau de dependência e cessação na população de estudo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo é do tipo observacional com o delineamento transversal e faz parte de um projeto maior, intitulado “Estudo da vulnerabilidade de moradores da área sob influência do Polo Industrial na região de Campos Elíseos, Baixada Fluminense, a contaminantes químicos ambientais”. Fizeram parte do estudo indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, e foram excluídos os indivíduos incapazes de responder ao questionário ou dos quais não se conseguiu uma quantidade de material biológico suficiente para as análises laboratoriais. Em uma amostra de conveniência, a população do estudo foi composta por 449 moradores de Campos Elíseos, Duque de Caxias, Rio de Janeiro. Foram realizadas visitas agendadas a Campos Elíseos, entre 2016 e 2019, para aplicação de questionário em forma de entrevista e coleta de sangue dos participantes da pesquisa, mediante ao esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Campos Elíseos acomoda o maior complexo industrial da América Latina, com empresas do tipo petroquímicas, transformadoras e termoelétricas, dentre elas, a Refinaria de Duque de Caxias (REDUC), a segunda maior petroquímica do país. A população de Campos Elíseos é altamente vulnerável pela soma das exposições a diversos componentes químicos provenientes das fábricas, e pela falta de abastecimento de água e assistência à saúde da região (BARATA-SILVA, 2017; CAMAZ, 2015). O tabagismo seria mais um fator de forte contribuição para a vulnerabilidade desta população pelos reconhecidos agravos à saúde associados à exposição ao cigarro.

5.2 COLETA DE DADOS

5.2.1 Questionário

Foi aplicado um questionário do tipo semiestruturado, construído pela equipe de pesquisa. A coleta de dados foi realizada sob forma de entrevista individual, por um dos membros da equipe de pesquisa, para obtenção de informações pertinentes ao estudo. As perguntas tiveram o objetivo de coletar informações referentes a características da população e do tabagismo (Apêndice):

5.2.1.1 *Status* tabágico

Mediante as respostas obtidas pelo questionário, os indivíduos foram classificados quanto ao *status* tabágico em três categorias: Nunca fumante (indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos de 100 cigarros durante toda a vida); Ex-fumante (indivíduos que já fumaram pelo menos 100 cigarros durante toda a vida, mas pararam de fumar há pelo menos 1 ano); Fumante atual (indivíduos que já fumaram 100 ou mais cigarros durante a vida e fumam atualmente ou pararam de fumar há menos de 1 ano) (HEY; PERERA, 2005; JIN et al., 2006; IBGE, 2009).

5.2.1.2 Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTDN)

Os indivíduos classificados como fumantes atuais responderam ao Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTDN) adaptado para o português, que foi incorporado ao questionário construído para esta pesquisa. O Teste de Fagerström avalia o grau de dependência à nicotina e trata-se de um questionário constituído por seis perguntas com alternativas para resposta. (FAGERSTRÖM, SCHNEIDER, 1989; CARMO & PUEYO, 2002).

5.2.2 Amostras sanguíneas

Na mesma ocasião das entrevistas, foram coletadas em tubos com anticoagulante EDTA, amostras de 5mL de sangue de cada participante do estudo. As amostras foram levadas para o setor de Toxicogenética do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH)/ENSP/FIOCRUZ e para a Policlínica Newton Alves Cardozo, para realização, respectivamente, de genotipagem e hemograma.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS

A determinação dos três polimorfismos foi realizada por genotipagem, a partir de uma solução de DNA genômico obtida a partir de 500 µL de sangue total de cada participante do estudo. A extração das amostras de DNA seguiu o protocolo metodológico desenvolvido no setor de Toxicogenômica do Laboratório Toxicologia do CESTEHE, baseado na técnica de *Salting-Out* (SAMBROOK, 2001). Após a extração, o DNA obtido foi quantificado por

espectrofotometria, no equipamento NanoDrop® 2000 (ThermoFisher Scientific).

Os polimorfismos *CHRNA5*, *CHRNA3* e *TaqIA* foram genotipados pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real, por meio do sistema de discriminação alélica TaqMan® *SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Os ensaios de oligonucleotídeos iniciadores e sondas específicos para cada SNP (TaqMan Assay™) foram adquiridos da empresa Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific (ensaios: *CHRNA5* rs16969968: C_26000428_20; *CHRNA3* rs578776: C_721253_10; *TaqIA* rs1800497; C_7486676_10). A tabela 2 apresenta as características e o conjunto de sondas utilizadas para a análise de cada um dos polimorfismos estudados. O preparo das placas contendo o meio reacional de cada amostra foi realizado em ambiente estéril, em cabine de fluxo laminar. Controles positivos e negativos foram usados em cada placa, respectivamente, a fim de verificar a especificidade e possíveis contaminações. Além disso, para verificar a eficiência da genotipagem, 10% das amostras foram aleatoriamente selecionadas e submetidas à genotipagem novamente.

Tabela 2. Sondas utilizadas para o ensaio de genotipagem dos polimorfismos em estudo.

Polimorfismo	Gene	Região	Varição	Ensaio TaqMan	Sonda
rs16969968	<i>CHRNA5</i>	Exon 5	G>A	C_26000428_20	TAGAAACACAT TGGAAGCTGCG CTC[A/G]ATTCT ATTCGCTACATT ACAAGACA
rs578776	<i>CHRNA3</i>	3'UTR ¹	C>T	C_721253_10	TGAATAACTAG GCATGATTCTC AT[A/G]GTATAA TTTAGAAGTATG CAAGAGA
rs1800497	<i>DRD2/ANKK1</i>	Exon 8	C>T	C_7486676_10	CACAGCCATCCT CAAAGTGCTGG TC[A/G]AGGCAG GCGCCCAGCTG GACGTCCA

¹ 3'UTR = Região 3' não traduzida.

Os ensaios foram otimizados e para cada reação de PCR foi utilizado 4 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific), 0,25 μ L de cada ensaio específico de oligonucleotídeos iniciadores e sondas (TaqMan® *SNP Genotyping Assay*, Applied Biosystems, Thermofisher Scientific; concentração 40x); 20ng de DNA; e água para um volume final de 8 μ L. O equipamento termociclador modelo 7500 Real-Time System 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific), foi utilizado para a realização da PCR, nas seguintes condições de temperatura: uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida por e de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto.

A figura 14 mostra o gráfico de discriminação alélica do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968, onde cada amostra é representada por um ponto. O software faz o agrupamento das amostras em correspondência com a fluorescência emitida pelas sondas alelo-específicas VIC (eixo X) e FAM (eixo Y). De acordo com a posição no gráfico, é possível realizar a distinção entre os três genótipos possíveis.

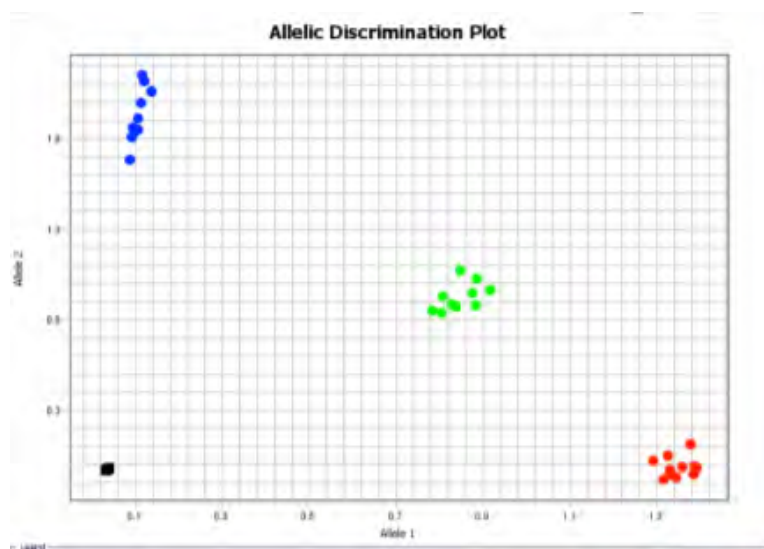


Figura 14. Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968 por PCR em tempo real.

Em azul, no eixo X: genótipo homocigoto *AA*; em vermelho: genótipo heterocigoto *AG*; em verde, no eixo Y: genótipo homocigoto *GG*. Os controles negativos são representados pelo quadrado em preto. Fonte: da autora.

Ao analisar cada amostra individualmente, por meio do padrão de fluorescência emitido durante a reação, é possível fazer a confirmação da determinação genotípica (Figura 15).

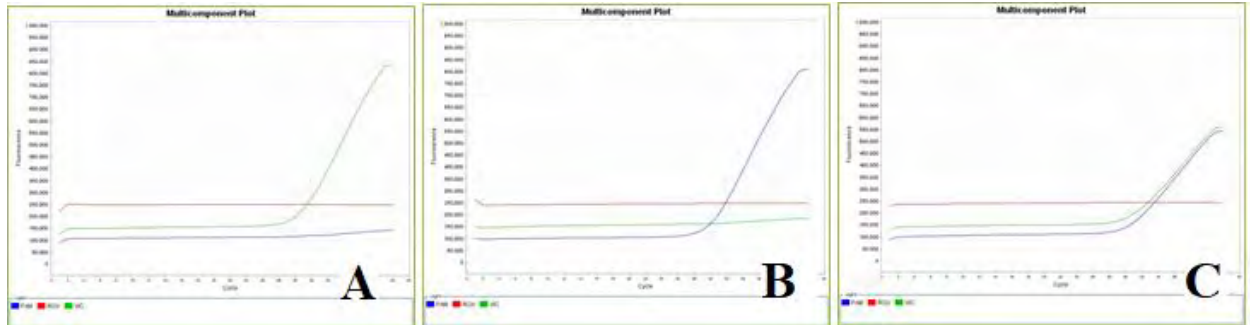


Figura 15. Curvas de emissão de fluorescência do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968.

No caso exemplificado, *CHRNA5* rs16969968, VIC corresponde ao alelo variante *A*, e FAM ao alelo selvagem *G*, conforme designado pelo fabricante. Quando há a presença de uma única curva acima da ROX, seja VIC ou FAM, o genótipo é homocigoto (fig. **A**: homocigoto variante *AA*; fig. **B**: homocigoto selvagem *GG*). Quando se observa a presença das duas curvas VIC e FAM, o genótipo é heterocigoto (fig. **C**: heterocigoto *GA*). Fonte: da autora.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SPSS® (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA) versão 20. O nível de significância adotado foi de 95%. Para testar a normalidade das variáveis foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio-padrão (DP), enquanto as categóricas foram apresentadas por frequências. O Teste de Man-Witney, Kruskal-Wallis e o Teste Qui-quadrado (χ^2) foram usados para avaliar diferenças nas médias e frequências. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado pelo teste χ^2 .

O risco para o tabagismo foi avaliado pela comparação entre os grupos “Nunca fumantes” e “Fumantes atuais + Ex-fumantes”. A idade de iniciação do hábito tabágico e a cessação foram avaliadas entre os Fumantes atuais e Ex-fumantes. O grau de dependência, definido pelo Teste de dependência nicotínica de Fagerström (FTND), e o número de cigarros consumidos por dia (CPD) foram analisados entre os Fumantes atuais.

O teste de Regressão logística foi utilizado para avaliar a possível associação entre cada polimorfismo, a cessação e o risco para o tabagismo, considerando o *status* tabágico como variável dependente e ajustado por variáveis de confundimento. As associações entre os polimorfismos e a idade de início, o número de cigarros consumidos por dia (CPD) e o grau de dependência nicotínica segundo Fagerström (FTND) foram estimadas pela comparação de médias, com ajuste para possíveis fatores de confundimento, utilizando o modelo de Regressão linear. Para a construção do modelo final foi considerada a importância biológica de cada variável e o grau de significância estatística na análise univariada, considerando um *p*-valor de entrada no modelo de 0,20 e um *p*-valor de saída do modelo de 0,05 para controlar os possíveis fatores de confundimento.

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP) (CAAE 40514415.0.0000.5240).

A aplicação do questionário e a coleta de sangue só foram realizadas após o esclarecimento da pesquisa e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), individualmente, pelos participantes. Todos os participantes receberam uma cópia do TCLE e foram informados de que a sua identidade não seria revelada em qualquer publicação resultante deste estudo. Os resultados das análises laboratoriais foram entregues em mãos exclusivamente a cada participante do estudo e os indivíduos com alterações nos hemogramas foram encaminhados para atendimento médico no ambulatório do CESTEH.

6 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1 PRIMEIRO ARTIGO DA TESE

Genetic variability in the neurobiology of nicotine dependence: effects on smoking behavior (submetido à revista científica para publicação, em junho de 2020)

Neste artigo foi realizada uma revisão integrativa com o objetivo de avaliar a variabilidade genética na neurobiologia do tabagismo e seus efeitos no comportamento do tabágico. No total, foram selecionados cento e dezessete estudos, a partir dos quais foi possível avaliar a neurobiologia do fumo através dos mecanismos moleculares de desenvolvimento da adicção, baseado no caráter psicoativo da nicotina.

Genetic variability in the neurobiology of nicotine dependence: effects on smoking behavior

A variabilidade genética da neurobiologia da dependência nicotínica: reflexos no comportamento tabágico

Short title: Genetic variations in the neurobiology of smoking behavior

Caroline de Lima Mota¹, Cristiane Barata-Silva², Simone Mitri¹, Josino Costa Moreira¹,

¹ Departamento de Toxicogenética, Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

² Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: carolinelima_bio@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: Smoking dependence is a chronic disease and a public health problem. The neurobiology of nicotine addiction can explain smoking behavior. This system has genetic variability that has been associated with vulnerability to dependence. Genetic variability in the neurobiology of smoking can help to understand why individuals exposed to drugs may or may not become addicted. This study aims to address genetic variability in the neurobiology of smoking addiction. **Methods:** This work involved a search of the main scientific research on genetic variability in the neurobiology of smoking and its effects on smoking behavior. One hundred and seventeen studies were selected, most of which highlighted polymorphisms in the genes of nicotinic receptors, dopamine receptors and nicotine metabolism. **Results:** The majority of studies have focused on genes related to the activation of the dopaminergic reward system by nicotine. Combinations between different polymorphisms was also highlighted, showing that interactions can determine a genetic profile of predisposition to smoking addiction. Additionally, gender and ethnicity were identified as relevant factors. **Conclusion:** Knowledge of the genetic bases involved in the individual response to smoking can enable a better understanding of inter-individual differences in smoking behavior and contribute to improving the treatment of addiction.

Keywords: Smoking; Genetic polymorphisms; Nicotinic dependence; Smoking behavior; Neurobiological genetic variability.

Resumo

Introdução: A dependência nicotínica é uma doença crônica e um problema de saúde pública. O comportamento tabágico pode ser explicado pela neurobiologia da adicção, cujas variações genéticas têm sido associadas à dependência. Esta variabilidade ajuda a compreender por que indivíduos expostos a drogas podem ou não se tornar adictos. Este estudo tem como objetivo abordar a variabilidade genética na neurobiologia da adicção ao tabagismo. **Método:** Foi feita uma pesquisa nas principais bases de dados científicos sobre a variabilidade genética na neurobiologia do tabagismo e seus efeitos no comportamento do tabagismo. Cento e dezessete estudos foram selecionados, em sua maioria destacando polimorfismos nos genes de receptores nicotínicos, receptores de dopamina e de metabolismo da nicotina. **Resultados:** A maioria dos estudos concentrou-se em genes relacionados à ativação do sistema de recompensa dopaminérgico pela nicotina. Determinadas combinações entre genótipos de diferentes polimorfismos também se destacaram, mostrando que interações gênicas podem determinar um perfil genético de predisposição ao vício de fumar. Além disso, gênero e etnia foram identificados como fatores relevantes. **Conclusão:** O conhecimento das bases genéticas envolvidas na resposta individual ao tabagismo pode permitir uma melhor compreensão das diferenças interindividuais no comportamento tabágico e contribuir para melhoria dos tratamentos disponíveis para a dependência.

Palavras-chave: Tabagismo; Susceptibilidade genética; Dependência nicotínica; Comportamento tabágico; Variabilidade genética neurobiológica.

INTRODUCTION

Tobacco smoking is a public health problem internationally recognized as a chemical dependency, with industrial cigarettes being considered the most important form of consumption¹. According to the *Tobacco Atlas*, 5.7 trillion cigarettes were consumed worldwide in 2016². The industrial cigarette is composed of more than 9 thousand substances, among which nicotine, a psychoactive substance, is responsible for the addictive effects³. The verification of this psychoactive role means smoking is classified, according to the *Review of the International Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD10), in the group of mental and behavioral disorders related to the use of psychoactive substances⁴.

Tobacco smoke is the main cause of preventable mortality and morbidity in the world and accounts for the deaths of 8 million people per year. Of these, 1.2 million are non-smokers exposed to secondhand smoke⁵. For instance, in 2017, smoking was associated with 12.6% of the total deaths in Brazil⁶. In Brazil, smoking among men has been decreasing, while among women it has remained stable. This data indicates a new public health concern regarding the damage to women's health and an increase in tobacco-related diseases⁷. Although overall consumption has declined in recent years, the future path of global tobacco control is still uncertain and future projections are worrying⁸. It is estimated that by the end of 2020, more than 10 million people will die from cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer caused by tobacco use. Half of these deaths will occur during the productive years, with an individual loss of 10 to 20 years of life. In 2030, 80% of consumption-related deaths will occur in developing countries⁹.

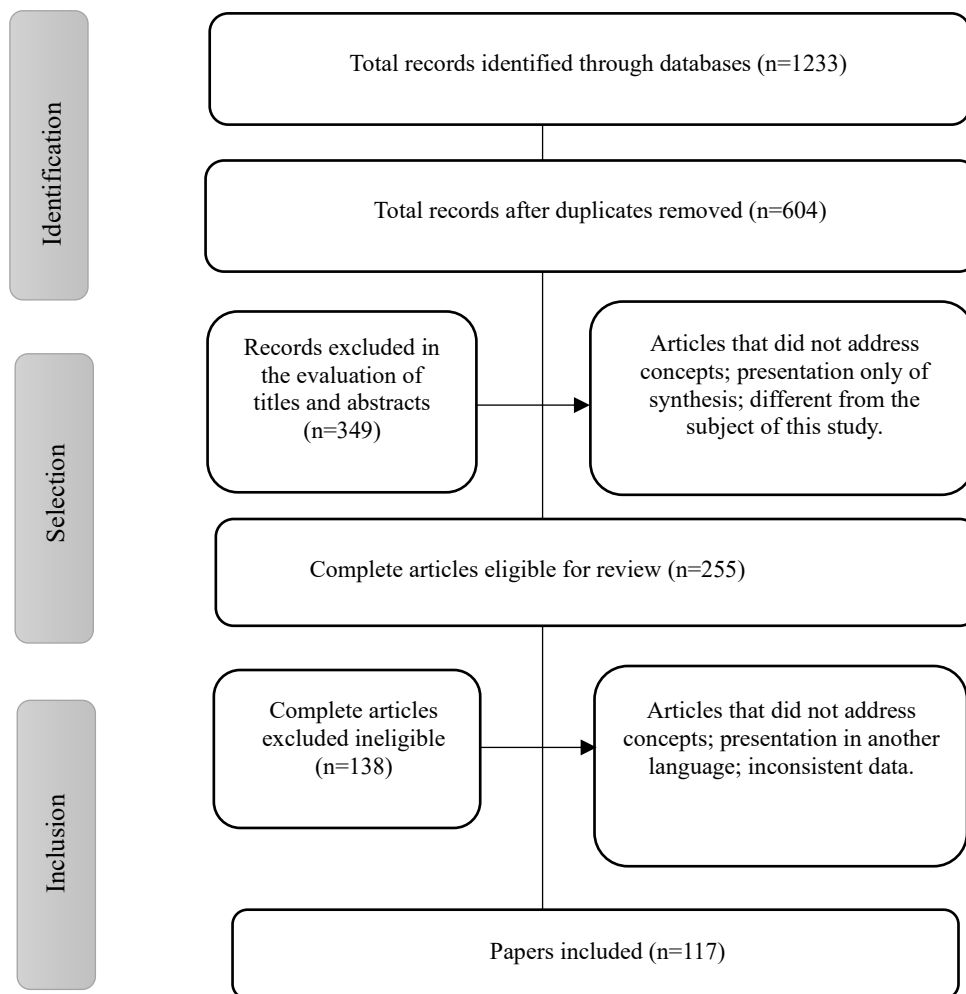
Despite knowledge of these adverse health effects, smoking addiction explains why about 70% of smokers want to quit smoking, but have not succeeded. Of these, about a third are successful for just one day and less than 10% are abstinent for twelve months¹⁰, with cessation treatment being successful in only 35% of cases¹¹. Smoking behavior is complex and multifactorial, determined by a combination of biological, psychological and environmental factors¹². Heredity is a strong component of tobacco use and its influence on dependence is at least 50%^{13,14}. Genetic variations can influence up to 80% of characteristics of smoking behavior, such as initiation, persistence in smoking and successful cessation¹⁵.

Genetic variability in the neurobiology variability of smoking, as well as of other addictions, can help to understand why individuals exposed to drugs may or may not become addicted. In addition, knowledge of the genetic bases involved in the individual response to smoking can contribute to improving the treatment of addiction¹⁶. In this sense, this study aims to address genetic variability in the neurobiology of smoking addiction with a focus on polymorphic genes related to the nicotinic response and the dopaminergic reward pathway.

METHODOLOGY

This work involved a search of the main scientific research on genetic variability in the neurobiology of smoking and its effects on smoking behavior. Bibliographic searches were carried out between 2017 and 2020 in the PubMed, Scielo and Medline databases. The following terms were used: genetic susceptibility, polymorphic genes, smoking and nicotine

addiction. Articles in Portuguese and English published between 2000 and 2020 were selected and qualified, according to their abstracts, as possible candidates to provide technical-scientific bases for this paper. At the end of the search, duplicate references and unavailable full studies were excluded. Each abstract was analyzed and classified separately by two researchers as being outside or within the scope. In the end, 117 articles were selected and used as a theoretical basis for the preparation of this work. Flowchart 1 presents the stages of the identification, selection and inclusion of scientific articles.



Flowchart 1 Identification, selection and inclusion of scientific articles.

RESULTS AND DISCUSSION

Neurobiology of tobacco dependence

The neurobiology of smoking explains the molecular mechanism of the development of addiction based on the psychoactive character of nicotine. Inhaled nicotine is absorbed in the lungs from cigarette smoke and reaches the brain in 10 to 60 seconds, where it binds to nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in the mesolimbic system, producing the addictive effects of strengthening the smoking habit through activation of the dopaminergic reward system^{17,18}.

In the presence of nicotine, the flow of dopamine increases in the mesolimbic system, activating brain circuits to regulate feelings of pleasure and reward. The mesolimbic dopaminergic system is the main neurobiological structure associated with addiction to smoking and plays a crucial role in reinforcement¹⁹. This system is mainly composed of the ventral tegmental area and the accumbens nucleus. These regions are related to the mechanisms of addiction to nicotine, such as craving, memory, emotions related to use, tolerance and dysphoria due to abstinence^{18,20}. In addition to dopaminergic hyperactivity, serotonin is released in the acute phase of nicotine consumption. Additionally, prolonged exposure desensitizes the gamma-aminobutyric acid system (GABAergic), an inhibitor of brain systems, which reinforces the behavior of compulsive use of nicotine^{17,18}.

The mechanism of activation of the dopaminergic reward system by nicotine occurs by binding nicotine to the nicotinic receptors of presynaptic neurons (nAChRs), thereby opening cationic channels and, consequently, causing neuronal depolarization. Under these circumstances, dopamine and other neurotransmitters are released in the synaptic cleft and bind to dopamine receptors (DRDs) in post-synaptic neurons, transmitting the signal between neurons. Dopamine is released from the synaptic neurons and some of it is captured by dopamine transporters (DAT) in the presynaptic neurons. After reuptake, dopamine can then be repackaged into vesicles for use in future neurotransmissions or can be degraded by monoamine oxidase (MAO) and catechol-O-methyltransferase (COMT)¹⁸ (Figure 2).

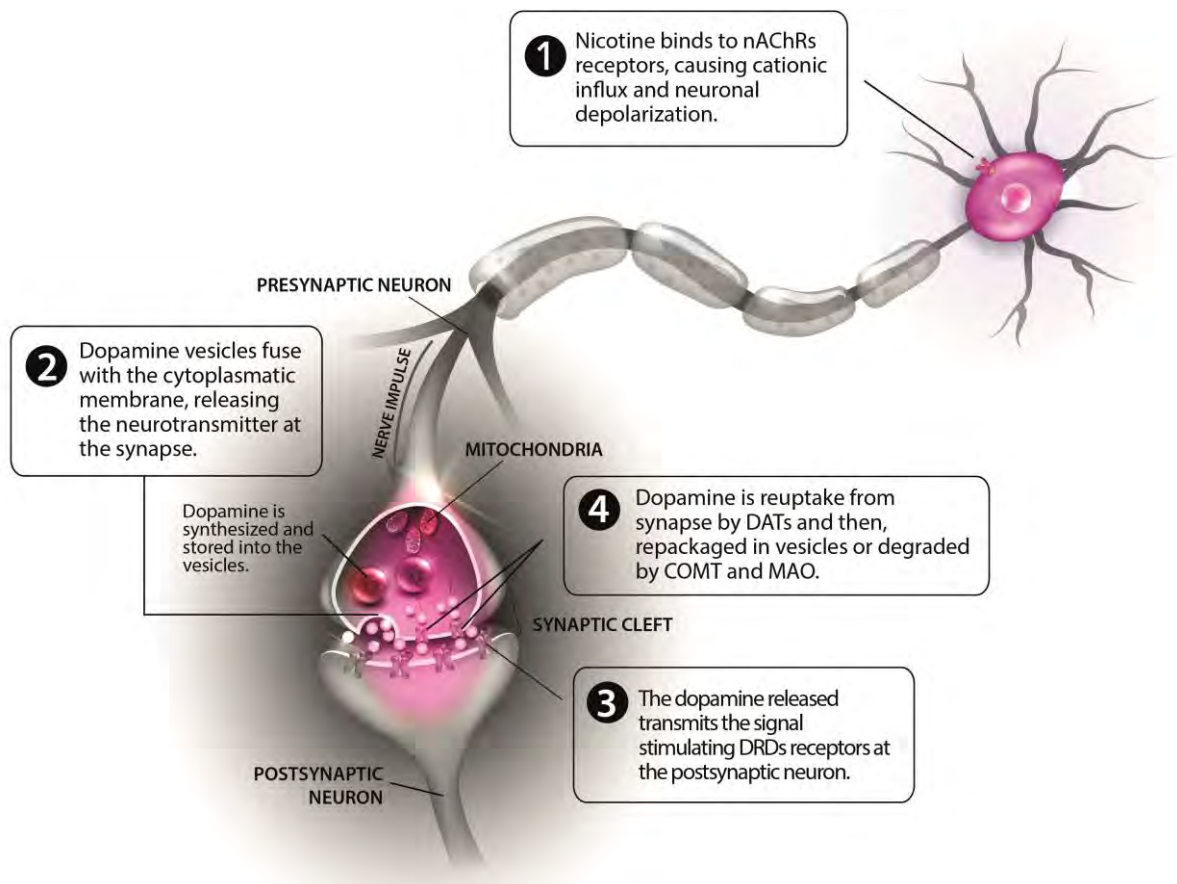


Figure 2 Activation of the dopaminergic reward system by nicotine (nAChRs: Nicotinic acetylcholine receptors; DRDs: Dopamine receptors; DATs: Dopamine transporters; MAO: Monoamine oxidase; COMT: Catechol-O-methyltransferase).

The genes involved in the neurobiology of smoking behavior have been investigated as candidates for individual susceptibility to smoking. Among these, special attention has been paid to those related to the nicotinic response and to the neurotransmitter dopamine, considered the key in substance addiction and abuse^{10,21}.

The first group of genes addressed in this study is directly related to the nicotinic response and is represented by the *CYP2A6* metabolism gene (Cytochrome P4502A6) and by the genes encoding the nicotinic acetylcholine receptors, *CHRN*^{10,22}. The second group includes the genes involved in the dopaminergic pathway, which are capable of interfering with the concentration of dopamine in the synaptic cleft. These are the dopaminergic receptor genes

DRD2/ANKK1 and *DRD4*, the carrier gene of dopamine transporters (*SLC6A3*) and the genes of metabolism Dopamine B-hydroxylase (*DBH*), Catechol O-methyl transferase (*COMT*) and Monoamine oxidase (*MAO*)^{17,19}. Table 1 presents the main characteristics of the genes studied in this work.

GENE VARIABILITY RELATED TO NICOTINIC RESPONSE

Polymorphism of *CYP2A6*

Approximately 80% of nicotine is converted into cotinine by the action of the enzyme expressed by the Cytochrome P4502A6 gene (*CYP2A6*). Thus, variations in this gene may alter the enzymatic activity, interfering with the concentration of nicotine that reaches the target sites²². Apparently, *CYP2A6* functional polymorphisms, in addition to affecting smoking behavior, are also associated with an increased risk of lung cancer²³.

An association between *CYP2A6* genotypes and nicotine dependence has been reported using the Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) to verify the degree of nicotine dependence. Carriers of the wild allele *CYP2A6*1*, called normal metabolizers, are the most susceptible to tobacco dependence due to needing to consume a greater number of cigarettes to maintain satisfactory levels of nicotine in the blood²⁴. Other polymorphic variants of the *CYP2A6* gene, such as the *CYP2A6*9* and *CYP2A6*12*, have smaller enzymatic activity and the *CYP2A6*2* and *CYP2A6*4* variants are associated with a total loss of activity. So, depending on the gene variant carried, an individual is categorized as a normal, intermediate or slow metabolizer, with 100%, less than 75% or less than 50% enzymatic efficiency, respectively^{22,24}.

Wassenaar *et al.* observed higher quantity of cigarettes consumed per day by individuals possessing normal metabolizer genes in comparison with those having slow metabolizers²⁵. Although other studies have not reported the same association²⁶ or even divergent results^{27,28}, several works have shown a direct association between *CYP2A6* genotype of lower enzyme activity and the lower risk of becoming a smoker, less nicotine dependence, fewer cigarettes consumed and greater success in cessation^{24,25,29-31}.

***CHRN* gene polymorphisms**

The binding of nicotine to nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) increases the concentration of dopamine and other neurotransmitters, promoting the activation of reward mechanisms, which is crucial for smoking behavior. Some variations found in the clusters of genes encoding nAChR in dopaminergic neurons are involved in the development of addiction³². Special attention has been given to polymorphisms in the *CHRNA4/CHRN2*, *CHRN3/CHRNA6* and *CHRNA5/CHRNA3/CHRN4* gene clusters^{33,34}.

In 2007, an analysis of 3713 Single Nucleotides Polymorphisms (SNP) polymorphisms was published, highlighting the association of SNPs *CHRNA3* (rs578776 C>T; rs1051730 C>T) and *CHRNA5* (rs16969968 G>A) with smoking³⁴. Based on this, several other studies have reported the association of gene variants of nicotinic acetylcholine receptors with nicotinic dependence in different groups, though very few have focused on the Brazilian population^{35,36}.

Several authors have found associations between the variant alleles of rs578776, rs1051730 and rs16969968 with characteristics of smoking behavior, such as risk for smoking, quantity of cigarettes consumed and degree of dependence^{25,33,35,37-42}. These SNPs have also been associated with smoking cessation, but with inconsistent results. In general, studies have shown significant association of the T allele of rs1051730 and A allele of rs16969968 with a lower probability of cessation and, inversely, between T allele of rs578776 and greater chance of cessation⁴³⁻⁴⁶. But there are contradictory findings^{29,36,47,48}. Genetic variations in *CHRN2* and *CHRNA4* also seem to interfere with individuals' responses to drug treatments for smoking cessation. An example is the lower incidence of abstinence symptoms related to polymorphisms in *CHRN2* and *CHRNA4* in individuals using the drug varenicline, which acts on neuronal nicotinic cholinergic receptors by stimulating the release of dopamine^{49,50}. A recent study highlights the contribution of *CHRNA4* (rs1044396 C> T) polymorphism in the choice of the best drug for anti-smoking treatment. According to this study, the effectiveness of varenicline is higher for patients with a CT or TT genotype than for those with CC⁵¹.

Swan *et al.* showed an association of variant A of the *CHRN2* polymorphism (rs2072661 G> A) with nausea, an important adverse effect when discontinuing the use of varenicline⁵⁰. Additional studies have reinforced the association of the variant T allele of rs1044396 (*CHRNA4*) and the wild G allele of rs2072661 (*CHRN2*) with a greater possibility of quitting, lower risk of becoming a smoker, less dependence and lower cotinine levels^{29,49,50,52-56}.

GENE VARIABILITY OF THE DOPAMINERGIC PATHWAY

Polymorphisms of the *DRD2* and *DRD4* genes

Some functional variations have been found in the genes encoding dopamine receptors (*DRDs*) related to smoking. However, the most studied, for their association with smoking, are the polymorphs *DRD2* rs1800497 and *DRD4-VNTR* [57,58]. Historically referred to as *DRD2 Taq1A*, the polymorph Taq1A (rs1800497 C> T) is a variation of the *ANKK1* gene (Ankyrin Repeat And Kinase Domain Containing 1), where the presence of the A1 (T) allele is related to lower expression of the *DRD2* dopamine receptor, which may interfere with the synaptic concentrations of the neurotransmitter. So, individuals with the A1 allele of this gene have a higher risk of being a smoker⁵⁹, starting smoking at a lower age, have a higher degree of dependence, smoke more cigarettes, have shorter periods of abstinence and make fewer attempts to quit smoking^{38,60,61}. However, no association has been found in other studies^{62,63}. Additionally, the A2 (C) allele may represent a risk in relation to the characteristics of smoking behavior^{58,64}.

The SNP can also interfere with the response to pharmacological therapies for cessation. David *et al.* found that the drug bupropion was effective only in smokers with the A2/A2 (CC) genotype⁶⁵. Swan *et al.* also observed that A2/A2 women were less likely to stop treatment with bupropion; however, the same associations were not observed in men⁶⁶. An identical effect was also observed in the females for Nicotine Replacement Therapy (NTR)⁶⁷. Other studies have reported an association between the A2 allele and a higher chance of abstinence and success in cessation^{65,68,69}. However, this is not a unanimous result⁶⁴.

A polymorphism of variable numerical repetition (VNTR) in the gene encoding the D4 receptor, *DRD4*, has also been investigated as a candidate for susceptibility to smoking addiction. Most studies have grouped the alleles into “long” (7 or more repetitions) or “short” (6 or less)⁷⁰. Long alleles have been associated with lower expression of the gene in comparison with the short alleles⁷¹. The long allele of this polymorphism has been associated with an increased risk for smoking, greater cigarette consumption, a greater risk of initiation and a greater degree of dependence^{57,72-74}. The relationship between smoking cessation and these groups has also been studied by several authors, but with divergent results. Leventhal *et al.* found that European individuals with the long allele group treated with bupropion have a greater

chance of abstinence compared with a placebo group⁷⁰. However, this result was not confirmed in other studies⁷⁵. The influence of polymorphism was also studied for Nicotine Replacement Therapy (NTR) in individuals with European ancestors; this study showed that those possessing long alleles had a reduced probability of cessation⁷². Other studies have not confirmed the association of *DRD4* VNTR and smoking behavior^{76,77}. These differences in findings reinforce the complexity of nicotine addiction and the need for future studies.

Polymorphism of the *SLC6A3* gene

The dopamine transporter (DAT), which is encoded by the *SLC6A3* gene, mediates the active reuptake of dopamine from the synapse. Polymorphism of the *SLC6A3* gene is linked to dopamine transport in the synaptic cleft. It is formed by the repetition of a 40 base pair sequence, which can interfere with the expression of the *SLC6A3* gene that encodes the dopamine transport protein (D28). Alleles containing 10 and 9 repeats are the most frequent. The 10-repeats allele is associated with a higher rate of gene transcription and, therefore, with higher levels of the carrier protein⁷⁸. Studies have shown that individuals with 9-repeats allele are less likely to start smoking before the age of 16, have a shorter smoking time, longer periods of abstinence and are more likely to quit smoking⁷⁹⁻⁸³. However, controversial results⁸⁴ and a lack of significant association⁸⁵ demonstrate the need for further studies on this subject.

A meta-analysis study showed that, although the genetic variations of *SLC6A3* are related to dopamine regulation, there is a lack of evidence on their influence on smoking cessation, given the multifactorial nature of smoking⁷⁸. However, this study reinforced the importance of gene interaction in susceptibility to smoking and showed that the interaction between the *DRD2 Taq1A* and *SLC6A3* genes prolongs abstinence time and influences smoking cessation with the use of bupropion⁸⁰. The results showed the role of gene-gene interaction in the probability of relapse: smokers possessing the A2 allele of *DRD2 Taq1A* and *SLC6A3-9* had significantly higher rates of abstinence at the end of treatment and a longer latency period for relapse⁸⁰.

Polymorphisms of the *DBH* gene

The *DBH* gene encodes the enzyme of the same name, which converts dopamine to norepinephrine; this means that lower levels of transcription or activity may result in higher concentrations of dopamine⁷². Several studies have reported functional polymorphisms in this gene related to smoking behavior^{64,86}. The literature shows an association between rs77905 (A>G) polymorphism and nicotine dependence^{64,87,88}. Johnstone *et al.* reported an association between individuals with the GG genotype, in interaction with the A2/A2 genotype of the *DRD2 Taq1A* polymorphism, and greater persistence of smoking, as well as less effectiveness of cessation due to transdermal nicotine replacement⁶⁴. However, McKinney *et al.* observed that homozygous smokers of the G allele smoked fewer cigarettes than smokers with the A allele⁸⁷. Some studies found no significant association between this SNP and smoking^{68,69}. For instance, according to some authors, the SNP rs3025343 (G>A) is associated with smoking behavior, especially the G allele, which is related to smoking cessation^{90,91}, but this is still controversial because other studies haven't confirmed this association⁹².

Polymorphism of the *COMT* gene

Some functional polymorphisms of the *COMT* gene involved in dopamine degradation linked to smoking have already been identified⁹³. The rs4680 G>A variation (Val158/108Met) resulted in less enzyme activity. Therefore, the Val allele carriers showed low level of neurotransmitter dopamine and increased COMT activity in comparison with the Met allele^{94,95}.

Several studies have shown an association between the Val allele and characteristics of smoking dependence, such as the risk of smoking initiation, a greater degree of dependence and persistence^{96,97}. Enoch *et al.*, analyzing a sample of 342 individuals, observed this association in female smokers⁹³. A similar result was found by Nedic *et al.* in a study with 657 Caucasian men⁹⁴. Additionally, an association between the Met/Met genotype and greater success in cessation has been reported¹⁰⁰. A survey by Colilla *et al.*, with a sample of 290 women, reported the success of NRT in smokers of Caucasian ethnicity with the homozygous genotype Met/Met in comparison with those with the Val/Val genotype¹⁰¹. Another study of 749 Caucasians found that the Met/Met genotype is associated with higher abstinence rates¹⁰². However, some authors have reported different results^{98,99,103-105}.

Polymorphisms of the *MAOA* and *MAOB* genes

Relevant variations for smoking in both monoamine oxidase genes, *MAOA* and *MAOB*, have been reported, since both are involved in the degradation of some neurotransmitters, such as dopamine^{106,107}. As for the variability of the *MAOA* gene, research has focused on polymorphisms that affect smoking. One repetition polymorphism, the *MAOA VNTR* of the promoter region of the gene, which consists of 2 to 5 repetitions of a sequence of 30 base pairs, has been shown to be related to smoking. Two alleles containing 3 and 4-repeats are most common^{88,89,97,108-111}. The 4-repeats allele has been associated with a greater number of cigarettes consumed, compared to the 3-repeats allele, in Caucasian men with alcohol and tobacco dependence¹¹¹. Similarly, the 4-repeats allele has been associated with higher FTND scores and a higher degree of dependence in women¹⁰⁸. However, the data are not conclusive, since these findings have not been confirmed by other studies^{89,97,110}.

Other polymorphism in the *MAOA* gene, called *EcoRV* rs1137070 1460C> T, is capable of altering the transcriptional activity of this gene^{63,112}. In this case, the presence of T variant reduces the risk of smoking, especially in Caucasians¹¹³ and in women⁸⁸. However, some studies have found otherwise^{97,109}.

Regarding variations in the *MAOB* gene, the A allele of the *MAOB* rs1799836 polymorphism (A> G) is associated with a lower risk of heavy smoking in men¹¹³. However, this association is contradicted by other studies^{97,114}. Interactions between this SNP with other polymorphisms seem to interfere with the risk of smoking^{108,115}. The association of the A allele with smoking risk was found only in association with the B12 genotype of a polymorphism known as the *TaqIB* of the *DRD2* gene¹¹⁵. Other studies have shown that Japanese men with a combination of the *MAOB* rs1799836 G allele and the 3-repeats genotype of the *VNTR MAOA* started smoking later than those with other genotypic combinations¹⁰⁸.

Table 1 Neurobiological genetic polymorphisms associated with smoking behavior.

Polymorphism	Gene function	Variant allele	Effects on smoking behavior	References
<i>CYP2A6</i>	Nicotine metabolization	*2*4	Lower risk of becoming a smoker, lower degree of nicotine dependence, fewer quantity of cigarettes consumed, and greater success in cessation	24, 25, 29–31
<i>CHRNA5</i> <i>rs16969968</i>	Nicotinic acetylcholine receptor	A	Higher risk of becoming a smoker, greater quantity of cigarettes consumed, greater degree of nicotine dependence, lower chance of smoking cessation	33–35, 37, 39, 41, 44
<i>CHRNA3</i> <i>rs1051730</i>	Nicotinic Acetylcholine receptor	T	Higher risk of becoming a smoker, greater quantity of cigarettes consumed, earlier smoking initiation, higher cotinine levels, greater degree of nicotine dependence, lower chance of smoking cessation	25, 33, 38, 40, 42, 45, 116
<i>CHRNA3</i> <i>rs578776</i>	Nicotinic acetylcholine receptor	T	Lower risk of becoming a smoker, fewer quantity of cigarettes consumed, later smoking initiation, lower degree of nicotine dependence, greater chance of smoking cessation	37, 41, 46, 117
<i>CHRNA4</i> <i>rs1044396</i>	Nicotinic acetylcholine receptor	T	Higher chance of smoking cessation, lower risk of becoming a smoker, lower degree of nicotine dependence,	29, 49, 51, 52, 53, 54

			lower cotinine levels	
<i>CHRNA2</i> <i>rs2072661</i>	Nicotinic acetylcholine receptor	A	Lower chance of smoking cessation, greater degree of nicotine dependence	50, 55, 56
<i>DRD2/</i> <i>ANKK1</i> <i>rs1800497</i>	Dopamine receptor	A1 (T)	Lower chance of smoking cessation, higher risk of becoming a smoker, higher risk of regular use of tobacco, earlier smoking initiation, greater degree of nicotine dependence, greater quantity of cigarettes consumed, shorter periods of abstinence, fewer attempts to quit smoking, less effectiveness in TRN and bupropion	38, 60, 61, 65– 69
<i>DRD4 VNTR</i>	Dopamine receptor	Short allele	Lower risk of smoking, fewer cigarettes consumption, lower degree of dependence, higher chance of smoking cessation using TRN	57, 72–74
<i>SLC6A3 VNTR</i>	Dopamine reuptake	9-repeat	Later smoking initiation, shorter period of smoking, longer periods of abstinence, greater chance of smoking cessation	79–83
<i>DBH</i> <i>rs77905</i>	Dopamine metabolizing enzymes	G	Greater persistence of smoking, less effectiveness in TRN	64, 88
<i>DBH</i> <i>rs3025343</i>	Dopamine metabolizing enzymes	A	Lower chance of smoking cessation	90, 91
<i>COMT</i>	Dopamine	Met (A)	Decreased risk of being a	88, 93, 94, 96,

<i>rs4680</i>	metabolizing enzymes		smoker, later smoking initiation, lower degree of nicotine dependence, more effectiveness in TRN	97, 100–102
<i>MAOA VNTR</i>	Dopamine metabolizing enzymes	4-repeat	Greater quantity of cigarettes consumed, greater degree of nicotine dependence	108, 111
<i>MAOA rs1137070</i>	Dopamine metabolizing enzymes	T	decreased risk of being a smoker	88, 113
<i>MAOB rs1799836</i>	Dopamine metabolizing enzymes	G	Decreased risk of being a smoker, later smoking initiation	108, 115

CONCLUSION

There are many genes involved in the neurobiology of smoking. Several are polymorphic and, admittedly, some of these variations can affect smoking behavior.

The majority of studies have focused on genes related to the activation of the dopaminergic reward system by nicotine present in cigarettes as candidates for susceptibility to addiction. Due to their association with a higher risk of smoking, the polymorphisms found in the genes *CYP2A6*, *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA4*, *CHRNA2*, *DRD2*, *DRD4*, *SLC6A3*, *DBH*, *COMT*, *MAOA* and *MAOB* were addressed. Among these, the SNPs *CYP2A6* *1, *CHRNA3 rs578776*, *CHRNA5 rs16969968*, *CHRNA4 rs1044396*, *CHRNA2 rs2072661* and *DRD2 Taq1A* seem to most influence the development of addiction and the worsening of specific characteristics of smoking behavior, such as the number of cigarettes consumed, the age of initiation, the efficiency of drug therapy and cessation.

The relevance of genotypic combinations between different polymorphisms reinforces that interactions between genes can determine a genetic profile of predisposition to addiction. In addition, the sex and ethnicity of the studied populations proved to be important factors in the investigations, especially in the context of a diverse and mixed population. The effects of

genetic variability on smoking have received great attention. Advances in the field of pharmacogenetics have enabled a greater understanding of individuality in responses to drug therapies, both in terms of efficacy and adverse effects. Knowledge of the genetic variability of the neurobiology of smoking can help elucidate the issues inherent to smoking addiction and contribute to the development of more personalized and effective forms of treatment. However, the great variability of obtained results shows that this task is not simple. Apparently, it involves several factors. Therefore, more research is needed on this topic, especially considering population differences, the interference of environmental factors and interactions between different polymorphisms.

REFERENCES

1. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Tabagismo Um Grave Problema de Saúde Pública [Internet]. 2007 [cited 2018 Mar 4]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/observatorio_controle_tabaco/site/home/publicacoes/http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/t_Tabagismo.pdf>.
2. Drope J, Schluger N, Cahn Z, Drope J, Hamill S, Islami F, et al. The Tobacco Atlas. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies; 2018.
3. Rodgman A, Perfetti TA. The chemical components of tobacco and tobacco smoke. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013.
4. Araujo AJ. Manual De Condutas E Práticas Em Tabagismo. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. São Paulo: Ac Farmaceutica, 2012.
5. World Health Organization (WHO). Who report on the global tobacco epidemic 2019: Offer help to quit tobacco use. Geneva: World Health Organization, 2019.
6. Pinto M, Bardac A, Palacios A, Bin A, Alcaraz A, Rodríguez B, et al. Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos [Internet]. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2018 [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/carga-de-doenca-atribuivel-ao-uso-do-tabaco-no-brasil-e-potencial-impacto-do>
7. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Tabagismo e saúde da mulher [Internet]. 2020 [cited

2020 Apr 22]. Available from: <https://www.inca.gov.br/tabagismo/saude-da-mulher>.

8. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Consumo de cigarros per capita [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.inca.gov.br/en/node/1421>.

9. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2017 May 5]. Available from: http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/index.html

10. Chatkin JM. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. *J Bras Pneumol*. 2006 Dec;32(6):573–9.

11. Gu Z, Feng X, Dong X, Chan P. Smoking, genes encoding dopamine pathway and risk for Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2010 Sep;482(1):31–4.

12. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. Preventing Tobacco Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2012.

13. Hardie TL, Moss HB, Lynch KG. Genetic correlations between smoking initiation and smoking behaviors in a twin sample. *Addict Behav*. 2006 Nov;31(11):2030–7.

14. Maes HH, Sullivan PF, Bulik CM, Neale MC, Prescott CA, Eaves LJ, et al. A twin study of genetic and environmental influences on tobacco initiation, regular tobacco use and nicotine dependence. *Psychol Med*. 2004 Oct;34(7):1251–61.

15. Munafò M, Clark T, Johnstone E, Murphy M, Walton R. The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob Res*. 2004 Aug;6(4):583–97.

16. Salloum NC, Buchalter EL, Chanani S, Espejo G, Ismail MS, Laine RO, et al. From Genes to Treatments: A Systematic Review of the Pharmacogenetics in Smoking Cessation. *Pharmacogenomics*. 2018 Jul;19(10):861–71.

17. Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med*. 2010 Jun 17;362(24):2295–303.

18. Lewis A, Miller JH, Lea RA. Monoamine oxidase and tobacco dependence. *Neurotoxicology*. 2007 Jan;28(1):182–95.

19. Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*. 2005

Nov;8(11):1445–9.

20. Formigone M, Kessler F, Baldisserotto C, Pechansky, Abrahão K. Neurobiologia: mecanismos de reforço e recompensa e os efeitos biológicos e os efeitos comuns às drogas de abuso [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 23]. Available from: <http://www.aberta.senad.gov.br/medias/original/201612/20161212-174315-002/pagina-02.html>.

21. Ma Y, Yuan W, Jiang X, Cui W-Y, Li MD. Updated Findings of the Association and Functional Studies of DRD2/ANKK1 Variants with Addictions. *Mol Neurobiol*. 2015 Feb;51(1):281–99.

22. López-Flores LA, Pérez-Rubio G, Falfán-Valencia R. Distribution of polymorphic variants of CYP2A6 and their involvement in nicotine addiction. *EXCLI J*. 2017; 16: 174–196.

23. Yuan J-M, Nelson HH, Carmella SG, Wang R, Kuriger-Laber J, Jin A, et al. CYP2A6 genetic polymorphisms and biomarkers of tobacco smoke constituents in relation to risk of lung cancer in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis*. 2017 Apr;38(4):411–8.

24. Akrodou YM. CYP2A6 Polymorphisms May Strengthen Individualized Treatment for Nicotine Dependence. *Scientifica*. 2015; 1–7.

25. Wassenaar CA, Dong Q, Wei Q, Amos CI, Spitz MR, Tyndale RF. Relationship Between CYP2A6 and CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 Variation and Smoking Behaviors and Lung Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Sep 7;103(17):1342–6.

26. Tomaz PRX, Kajita MS, Santos JR, Scholz J, Abe TO, Gaya PV, et al. Cytochrome P450 2A6 and 2B6 polymorphisms and smoking cessation success in patients treated with varenicline. *Eur J Clin Pharmacol*. 2019 Nov;75(11):1541–5.

27. Chenoweth MJ, Sylvestre M-P, Contreras G, Novalen M, O’Loughlin J, Tyndale RF. Variation in CYP2A6 and tobacco dependence throughout adolescence and in young adult smokers. *Drug Alcohol Depend*. 2016 Jan; 158:139–46.

28. Olfson E, Bloom J, Bertelsen S, Budde JP, Breslau N, Brooks A, et al. CYP2A6 metabolism in the development of smoking behaviors in young adults: CYP2A6 and smoking behaviors. *Addict Biol*. 2018 Jan;23(1):437-447.

29. Gu F, Zhao C, Jiang T, Li X, Mao Y, Zhou C. Association Between Nicotine-dependent Gene Polymorphism and Smoking Cessation in Patients With Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2020 Mar;21(2):171–6.
30. Ito T, Tsuji M, Mori Y, Kanda H, Hidaka T, Kakamu T, et al. Effect of cyp2a6*4 genetic polymorphisms on smoking behaviors and nicotine dependence in a general population of Japanese men. *Fukushima J Med Sci*. 2015;61(2):125–30.
31. Lerman C, Tyndale R, Patterson F, Wileyto E, Shields P, Pinto A, et al. Nicotine metabolite ratio predicts efficacy of transdermal nicotine for smoking cessation. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Jun;79(6):600–8.
32. Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol*. 2016 Jan;53(1):472–84.
33. Buczkowski K, Sieminska A, Linkowska K, Czachowski S, Przybylski G, Jassem E, et al. Association between Genetic Variants on Chromosome 15q25 Locus and Several Nicotine Dependence Traits in Polish Population: A Case-Control Study. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1–8.
34. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet*. 2007 Jan 1;16(1):36–49.
35. Silva MR, Gattás GJF, Antonio J, Firigato I, Curioni OA, Gonçalves F de T. Polymorphisms of CHRNA3 and CHRNA5: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Dec;7(12):e998.
36. Tomaz PRX, Santos JR, Scholz J, Abe TO, Gaya PV, Negrão AB, et al. Cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit polymorphisms are associated with smoking cessation success in women. *BMC Med Genet*. 2018 Dec;19(1):55.
37. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, et al. Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *Am J Psychiatry*. 2008 Sep;165(9):1163–71.

38. De Ruyck K, Nackaerts K, Beels L, Werbrouck J, De Volder A, Meysman M, et al. Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. *Pharmacogenomics*. 2010 Aug;11(8):1053–63.
39. Lee S-H, Ahn W-Y, Seweryn M, Sadee W. Combined genetic influence of the nicotinic receptor gene cluster *CHRNA5/A3/B4* on nicotine dependence. *BMC Genomics*. 2018 Dec;19(1):826.
40. Mbarek H, van Beijsterveldt CEM, Jan Hottenga J, Dolan CV, Boomsma DI, Willemsen G, et al. Association Between rs1051730 and Smoking During Pregnancy in Dutch Women. *Nicotine Tob Res*. 2019 May 21;21(6):835-40.
41. Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al. The *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* Nicotinic Receptor Subunit Gene Cluster Affects Risk for Nicotine Dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*. 2009 Sep 1;69(17):6848–56.
42. Sorice R, Bione S, Sansanelli S, Ulivi S, Athanasakis E, Lanzara C, et al. Association of a variant in the *CHRNA5-A3-B4* gene cluster region to heavy smoking in the Italian population. *Eur J Hum Genet*. 2011 May;19(5):593–6.
43. Chen J, Kettermann A, Rostron BL, Day HR. Biomarkers of Exposure among U.S. Cigar Smokers: An Analysis of 1999-2012 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) Data. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Dec;23(12):2906-15.
44. Chen L-S, Hung RJ, Baker T, Horton A, Culverhouse R, Saccone N, et al. *CHRNA5* Risk Variant Predicts Delayed Smoking Cessation and Earlier Lung Cancer Diagnosis—A Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Apr 14;107(5):d1v100.
45. Munafò MR, Johnstone EC, Walther D, Uhl GR, Murphy MFG, Aveyard P. *CHRNA3* rs1051730 Genotype and Short-Term Smoking Cessation. *Nicotine Tob Res*. 2011 Oct 1;13(10):982-8.
46. Wang Q, Li S, Pan L, Li H, Yang X, Jiang F, et al. Association between variants in nicotinic acetylcholine receptor genes and smoking cessation in a Chinese rural population: Association of Genes With Smoking Cessation. *Am J Addict*. 2016 Jun;25(4):297–300.

47. Chuang Y-H, Paul KC, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Bordelon YM, Ritz B. Genetic variants in nicotinic receptors and smoking cessation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019 May; 62:57–61.
48. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti DV, et al. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. *Neuropsychopharmacology.* 2012 Feb;37(3):641–50.
49. Rocha Santos J, Tomaz PRX, Issa JS, Abe TO, Krieger JE, Pereira AC, et al. CHRNA4 rs1044396 is associated with smoking cessation in varenicline therapy. *Front Genet.* 2015 Feb 27; 6:46.
50. Swan GE, Javitz HS, Jack LM, Wessel J, Michel M, Hinds DA, et al. Varenicline for smoking cessation: nausea severity and variation in nicotinic receptor genes. *Pharmacogenomics J.* 2012 Aug;12(4):349–58.
51. Gaya PV, Scholz J, dos Santos JR, Tomaz PRX, Abe TMO, Nassif Junior M, et al. Could be applied genetic markers to smoking cessation treatment? *Tob Induc Dis.* 2018 Mar; 16(Suppl 1):A854.
52. Breitling LP, Dahmen N, Mittelstraß K, Rujescu D, Gallinat J, Fehr C, et al. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit $\alpha 4$ polymorphisms with nicotine dependence in 5500 Germans. *Pharmacogenomics J.* 2009 Aug;9(4):219–24.
53. Etter J-F, Hoda J-C, Perroud N, Munafò M, Buresi C, Duret C, et al. Association of genes coding for the α -4, α -5, β -2 and β -3 subunits of nicotinic receptors with cigarette smoking and nicotine dependence. *Addict Behav.* 2009 Sep;34(9):772–5.
54. Li MD, Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Lou X-Y, Garcia V, et al. Ethnic- and gender-specific association of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit gene (CHRNA4) with nicotine dependence. *Hum Mol Genet.* 2005 May 1;14(9):1211–9.
55. Perkins KA, Lerman C, Mercincavage M, Fonte CA, Briski JL. Nicotinic Acetylcholine Receptor 2 Subunit (CHRNA4) Gene and Short-Term Ability to Quit Smoking in Response to Nicotine Patch. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Oct 1;18(10):2608–12.
56. Wessel J, McDonald SM, Hinds DA, Stokowski RP, Javitz HS, Kennemer M, et al.

Resequencing of Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes and Association of Common and Rare Variants with the Fagerström Test for Nicotine Dependence. *Neuropsychopharmacol.* 2010 Nov;35(12):2392–402.

57.Das D, Tan X, Eastel S. Effect of model choice in genetic association studies: DRD4 exon III VNTR and cigarette use in young adults. *Am J Med Genet.* 2011 Apr;156(3):346–51.

58.Gordiev M, Engstrom PF, Khasanov R, Moroshek A, Sitdikov R, Dgavoronkov V, et al. Genetic analysis of polymorphisms in dopamine receptor and transporter genes for association with smoking among cancer patients. *Eur Addict Res.* 2013;19(2):105–11.

59.Verde Z, Santiago C, Rodríguez González-Moro JM, de Lucas Ramos P, López Martín S, Bandrés F, et al. ‘Smoking Genes’: A Genetic Association Study. Nogales-Gadea G, editor. *PLoS ONE.* 2011 Oct 26;6(10):e26668.

60.Clague J, Cinciripini P, Blalock J, Wu X, Hudmon KS. The D2 Dopamine Receptor Gene and Nicotine Dependence Among Bladder Cancer Patients and Controls. *Behavior Genetics.* 2010 Jan;40(1):49–58.

61.Radwan GN, El-Setouhy M, Mohamed MK, Hamid MA, Azem SA, Kamel O, et al. DRD2/ANKK1 TaqI polymorphism and smoking behavior of Egyptian male cigarette smokers. *Nicotine Tob Res.* 2007 Dec;9(12):1325–9.

62.Batra A, Gelfort G, Bartels M, Smolczyk H, Buchkremer G, Riess O, et al. The dopamine D2 receptor (DRD2) gene? A genetic risk factor in heavy smoking? *Addict Biol.* 2000 Oct;5(4):429–36.

63.Huang C-L, Ou W-C, Chen P-L, Liu C-N, Chen M-C, Lu C-C, et al. Effects of Interaction Between Dopamine D2 Receptor and Monoamine Oxidase A Genes on Smoking Status in Young Men. *Biol Res Nurs.* 2015 Jul;17(4):422–8.

64.Johnstone EC, Yudkin PL, Hey K, Roberts SJ, Welch SJ, Murphy MF, et al. Genetic variation in dopaminergic pathways and short-term effectiveness of the nicotine patch. *Pharmacogenetics.* 2004 Feb;14(2):83–90.

65.David SP, Strong DR, Munafò MR, Brown RA, Lloyd-Richardson EE, Wileyto PE, et al. Bupropion efficacy for smoking cessation is influenced by the DRD2 Taq1A polymorphism:

analysis of pooled data from two clinical trials. *Nicotine Tob Res.* 2007;9(12):1251–7.

66.Swan GE, Valdes AM, Ring HZ, Khroyan TV, Jack LM, Ton CC, et al. Dopamine receptor DRD2 genotype and smoking cessation outcome following treatment with bupropion SR. *The Pharmacogenomics J.* 2005 Feb;5(1):21–9.

67.Munafò MR, Johnstone EC, Murphy MFG, Aveyard P. Lack of association of DRD2 rs1800497 (Taq1A) polymorphism with smoking cessation in a nicotine replacement therapy randomized trial. *Nicotine Tob Res.* 2009 Apr;11(4):404–7.

68.Breitling LP, Twardella D, Hoffmann MM, Witt SH, Treutlein J, Brenner H. Prospective association of dopamine-related polymorphisms with smoking cessation in general care. *Pharmacogenomics.* 2010 Apr;11(4):527–36.

69.Cinciripini P, Wetter D, Tomlinson G, Tsoh J, De Moor C, Cinciripini L, et al. The effects of the DRD2 polymorphism on smoking cessation and negative affect: evidence for a pharmacogenetic effect on mood. *Nicotine Tob Res.* 2004 Apr;6(2):229–39.

70.Leventhal AM, David SP, Brightman M, Strong D, McGeary JE, Brown RA, et al. Dopamine D4 receptor gene variation moderates the efficacy of bupropion for smoking cessation. *Pharmacogenomics J.* 2012 Feb;12(1):86–92.

71.Preedy VR. *Neuroscience of nicotine: mechanisms and treatment.* 1st edition. Cambridge, MA: Elsevier; 2019. 503 p.

72.David SP, Munafò MR. Genetic variation in the dopamine pathway and smoking cessation. *Pharmacogenomics.* 2008 Sep;9(9):1307–21.

73.Laucht M, becker K, El-Faddagh M, Hohm E, Schmidt MH. Association of the DRD4 exon III polymorphism with smoking in fifteen-year-olds: a mediating role for novelty seeking? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2005 May;44(5):477–84.

74.Laucht M, Becker K, Frank J, Schmidt MH, Esser G, Treutlein J, et al. Genetic variation in dopamine pathways differentially associated with smoking progression in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2008 Jun;47(6):673–81.

75.Bergen AW, Javitz HS, Krasnow R, Nishita D, Michel M, Conti DV, et al. Nicotinic acetylcholine receptor variation and response to smoking cessation therapies. *Pharmacogenet*

Genomics. 2013 Feb;23(2):94–103.

76. Babic M, Nedic G, Muck-Seler D, Borovecki F, Pivac N. Lack of association between dopamine receptor D4 variable numbers of tandem repeats gene polymorphism and smoking. *Neurosci Lett*. 2012 Jun;520(1):67–70.

77. Luciano M, Zhu G, Kirk KM, Whitfield JB, Butler R, Heath AC, et al. Effects of dopamine receptor D4 variation on alcohol and tobacco use and on novelty seeking: Multivariate linkage and association analysis. *Am J Med Genet*. 2004 Jan 1;124B(1):113–23.

78. Choi HD, Shin WG. Meta-analysis update of association between dopamine transporter SLC6A3 gene polymorphism and smoking cessation. *J Health Psychol*. 2018;23(9):1250–7.

79. Erblich J, Lerman C, Self DW, Diaz GA, Bovbjerg DH. Effects of dopamine D2 receptor (DRD2) and transporter (SLC6A3) polymorphisms on smoking cue-induced cigarette craving among African-American smokers. *Mol Psychiatry*. 2005 Apr;10(4):407–14.

80. Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Hawk LH, Pinto A, et al. Effects of dopamine transporter and receptor polymorphisms on smoking cessation in a bupropion clinical trial. *Health Psychol*. 2003 Sep;22(5):541–8.

81. Ma Y, Yuan W, Cui W, Li MD. Meta-analysis reveals significant association of 3'-UTR VNTR in SLC6A3 with smoking cessation in Caucasian populations. *Pharmacogenomics J*. 2016 Feb;16(1):10–7.

82. O'Gara C, Stapleton J, Sutherland G, Guindalini C, Neale B, Breen G, et al. Dopamine transporter polymorphisms are associated with short-term response to smoking cessation treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Jan;17(1):61–7.

83. Schmid B, Blomeyer D, Becker K, Treutlein J, Zimmermann US, Buchmann AF, et al. The interaction between the dopamine transporter gene and age at onset in relation to tobacco and alcohol use among 19-year-olds. *Addict Biol*. 2009 Sep;14(4):489–99.

84. Vandenberg DJ, Bennett CJ, Grant MD, Strasser AA, O'Connor R, Stauffer RL, et al. Smoking status and the human dopamine transporter variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism: failure to replicate and finding that never-smokers may be different. *Nicotine Tob Res*. 2002 Aug;4(3):333–40.

85. Ton TG, Rossing M, Bowen DJ, Srinouanprachan S, Wicklund K, Farin FM. Genetic polymorphisms in dopamine-related genes and smoking cessation in women: a prospective cohort study. *Behav Brain Funct.* 2007;3(1):22.
86. Freire MTMV, Marques FZC, Hutz MH, Bau CHD. Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Mar;256(2):93–7.
87. McKinney EF, Walton RT, Yudkin P, Fuller A, Haldar NA, Mant D, et al. Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. *Pharmacogenetics.* 2000 Aug;10(6):483–91.
88. Shiels MS, Huang HY, Hoffman SC, Shugart YY, Bolton JH, Platz EA, et al. A community-based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-A). *Prev Med.* 2008 Jul;47(1):116–22.
89. Huang S, Cook DG, Hinks LJ, Chen X-H, Ye S, Gilg JA, et al. CYP2A6, MAOA, DBH, DRD4, and 5HT2A genotypes, smoking behaviour and cotinine levels in 1518 UK adolescents. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Dec;15(12):839–50.
90. Siedlinski M, Cho MH, Bakke P, Gulsvik A, Lomas DA, Anderson W, et al. Genome-wide association study of smoking behaviours in patients with COPD. *Thorax.* 2011 Oct 1;66(10):894–902.
91. The Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):441–7.
92. Hirvonen K, Korhonen T, Salomaa V, Männistö S, Kaprio J. Association of the DBH Polymorphism rs3025343 With Smoking Cessation in a Large Population-Based Sample. *Nicotine Tob Res.* 2017 Sep;19(9):1112–5.
93. Enoch M-A, Waheed JF, Harris CR, Albaugh B, Goldman D. Sex Differences in the Influence of COMT Val158Met on Alcoholism and Smoking in Plains American Indians. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Mar;30(3):399–406.
94. Nedic G, Nikolac M, Borovecki F, Hajnsek S, Muck-Seler D, Pivac N. Association study

of a functional catechol-o-methyltransferase polymorphism and smoking in healthy Caucasian subjects. *Neurosci Lett*. 2010 Apr;473(3):216–9.

95.Park S-J, Yi B, Lee H-S, Oh W-Y, Na H-K, Lee M, et al. To quit or not: Vulnerability of women to smoking tobacco. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2016 Jan 2;34(1):33–56.

96.Beuten J, Payne TJ, Ma JZ, Li MD. Significant Association of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Haplotypes with Nicotine Dependence in Male and Female Smokers of Two Ethnic Populations. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Mar;31(3):675–84.

97.Tochigi M, Suzuki K, Kato C, Otowa T, Hibino H, Umekage T, et al. Association study of monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase genes with smoking behavior. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Oct;17(10):867–72.

98.Guo S, Chen DF, Zhou DF, Sun HQ, Wu GY, Haile CN, et al. Association of functional catechol O-methyl transferase (COMT) Val108Met polymorphism with smoking severity and age of smoking initiation in Chinese male smokers. *Psychopharmacology*. 2007 Jan 31;190(4):449–56.

99.Munafo MR, Freathy RM, Ring SM, St Pourcain B, Davey Smith G. Association of COMT Val108/158Met Genotype and Cigarette Smoking in Pregnant Women. *Nicotine Tob Res*. 2011 Feb 1;13(2):55–63.

100.Munafò MR, Johnstone EC, Guo B, Murphy MFG, Aveyard P. Association of COMT Val108/158Met genotype with smoking cessation: *Pharmacogenet Genomics*. 2008 Feb;18(2):121–8.

101.Colilla S, Lerman C, Shields PG, Jepsen C, Rukstalis M, Berlin J, et al. Association of catechol-O-methyltransferase with smoking cessation in two independent studies of women. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Jun;15(6):393–8.

102.Johnstone EC, Elliot KM, David SP, Murphy MFG, Walton RT, Munafo MR. Association of COMT Val108/158Met Genotype with Smoking Cessation in a Nicotine Replacement Therapy Randomized Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun 1;16(6):1065–9.

103.Han D-H, Joe K-H, Na C, Lee Y-S. Effect of genetic polymorphisms on smoking

cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers: *Psychiatric Genetics*. 2008 Feb;18(1):11–6.

104.Omidvar M, Stolk L, Uitterlinden AG, Hofman A, Van Duijn CM, Tiemeier H. The effect of catechol-O-methyltransferase Met/Val functional polymorphism on smoking cessation: retrospective and prospective analyses in a cohort study: *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Jan;19(1):45–51.

105.Sun H, Guo S, Chen D, Yang F, Zou Y, Di X, et al. Association of functional COMT Val108/Met polymorphism with smoking cessation in a nicotine replacement therapy. *J Neural Transm*. 2012 Dec;119(12):1491–8.

106.Ducci F, Goldman D. The Genetic Basis of Addictive Disorders. *Psychiatr Clin North Am*. 2012 June; 35(2): 495–519.

107.Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):34.

108.Ito H, Hamajima N, Matsuo K, Okuma K, Sato S, Ueda R, et al. Monoamine oxidase polymorphisms and smoking behaviour in Japanese. *Pharmacogenetics*. 2003 Feb;13(2):73–9.

109.Jin Y, Chen D, Hu Y, Guo S, Sun H, Lu A, et al. Association between monoamine oxidase gene polymorphisms and smoking behaviour in Chinese males. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006 Oct;9(5):557–64.

110.Mota C, Mitri Nogueira S, Barata-Silva C, Pavesi T, Costa Moreira J. The MAOA VNTR polymorphism and smoking behavior in Brazilian males. *Biomed Genet Genomics*. 2017; 2(2): 1-5.

111.Wiesbeck GA, Wodarz N, Weijers H-G, Dursteler-MacFarland KM, Wurst F-M, Walter M, et al. A functional polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene is associated with the cigarette smoking quantity in alcohol-dependent heavy smokers. *Neuropsychobiology*. 2006;53(4):181–5.

112.Shen Z, Huang P, Wang C, Qian W, Luo X, Gu Q, et al. Interactions between monoamine oxidase A rs1137070 and smoking on brain structure and function in male smokers. *Eur J Neurosci*. 2019 Aug;50(3):2201–10.

113. Yang J, Wang S, Yang Z, Hodgkinson CA, Iarikova P, Ma JZ, et al. The contribution of rare and common variants in 30 genes to risk nicotine dependence. *Molecular Psychiatry*. 2015 Nov;20(11):1467–78.
114. Pehlivan S, Aydın PC, Uysal MA, Ciftci HS, Sever U, Yavuz FK, et al. Effect of monoamine oxidase B A644G variant on nicotine dependence and/or schizophrenia risk. *Arch Clin Psychiatry (São Paulo)*. 2019 Feb;46(1):21–4.
115. Costa-Mallen P, Costa LG, Checkoway H. Genotype combinations for monoamine oxidase-B intron 13 polymorphism and dopamine D2 receptor TaqIB polymorphism are associated with ever-smoking status among men. *Neurosci Lett*. 2005 Sep 9;385(2):158–62.
116. Budulac SE, Vonk JM, Postma DS, Siedlinski M, Timens W, Boezen MH. Nicotinic Acetylcholine Receptor Variants Are Related to Smoking Habits, but Not Directly to COPD. Liu C, editor. *PLoS ONE*. 2012 Mar 15;7(3):e33386.
117. Stephens SH, Hartz SM, Hoft NR, Saccone NL, Corley RC, Hewitt JK, et al. Distinct Loci in the CHRNA5/CHRNA3/ CHRNA4 Gene Cluster Are Associated With Onset of Regular Smoking. *Genetic Epidemiology*. 2013 Dec;37(8):846–59.

6.2 SEGUNDO ARTIGO DA TESE

O efeito do polimorfismo *TaqIA* (rs1800497) no comportamento do tabagismo em um grupo populacional Brasileiro (aceito em 2020, pela Revista Eletrônica Acervo Saúde, no prelo)

Este estudo analisou a associação entre um polimorfismo relacionado aos receptores de dopamina, conhecido como *TaqIA*, e o comportamento tabágico em 449 indivíduos brasileiros de ambos os sexos, residentes de Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ. As análises foram realizadas e ajustadas de acordo com as características sociodemográfica da população do estudo.

ARTIGOS ORIGINAIS

O efeito do polimorfismo *Taq1A (rs1800497)* no comportamento do tabagismo em um grupo populacional Brasileiro

The effect of the *Taq1A* polymorphism (*rs1800497*) on smoking behavior in a Brazilian population group

El efecto del polimorfismo *Taq1A (rs1800497)* sobre el comportamiento de fumar en un grupo de población Brasileño

Caroline de Lima Mota^{1*}, Simone Mitri¹, Cristiane Barata-Silva², Josino Costa Moreira¹.

RESUMO

Objetivo: Investigar a associação entre um polimorfismo relacionado aos receptores de dopamina, conhecido como *Taq1A*, e o comportamento tabágico em uma amostra da população Brasileira. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal, com 449 indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos. O histórico do comportamento tabágico foi obtido por meio de um questionário. Amostras de sangue foram genotipadas para *Taq1A (rs1800497)* por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. Análises de Regressão logística e linear foram usadas para verificar o efeito dos genótipos no comportamento tabágico. **Resultados:** 66,4% dos participantes eram Nunca fumantes, 12,2% Fumantes atuais e 21,4% Ex-fumantes. O alelo variante *T* de *Taq1A* foi associado ao início do tabagismo mais tardio em comparação a *CC* (16,97 vs. 15,09; IC 95%: 15,75-18,19; $p=0,02$). O alelo *T* também conferiu maior probabilidade de cessação em mulheres (OR= 3,17; 95% IC: 1,06-9,45; $p=0,04$). Nos homens não foi encontrada diferença significativa. Não foi observada associação entre o polimorfismo e o risco para se tornar fumante, CPD, e FTND. **Conclusão:** *Taq1A rs1800497* foi associado com um efeito protetor para idade de iniciação do tabagismo e maior probabilidade de cessação em mulheres, em uma amostra da população Brasileira.

Palavras-chave: Tabagismo; Saúde Pública; Receptores de dopamina D2; Abandono do uso de Tabaco; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Objective: To investigate the association between a polymorphism related to dopamine receptors, known as *Taq1A*, and smoking behavior in a Brazilian population sample. **Methods:** This is a cross-sectional study, with

¹Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH)/ Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ. *E-mail: carolinelima_bio@yahoo.com.br

²Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ

449 individuals of both sexes, over 18 years old. The history of smoking behavior was obtained through a questionnaire. Blood samples were genotyped for *TaqIA* (*rs1800497*) by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). Logistic and linear regression analyzes were used to verify the effect of genotypes on smoking behavior. **Results:** 66.4% of participants were Never smokers, 12.2% were Current smokers and 21.4% were Ex-smokers. The variant *T* allele of *TaqIA* was associated with later smoking initiation compared to *CC* (16.97 vs. 15.09; 95% CI: 15.75-18.19; $p = 0.02$). The *T* allele also conferred a higher probability of cessation in women (OR = 3.17; 95% CI: 1.06-9.45; $p = 0.04$). No significant difference was found in men. No association was observed between the polymorphism and the risk of becoming a smoker, CPD, and FTND. **Conclusion:** *TaqIA rs1800497* was associated with a protective effect for the age of initiation of smoking and a higher probability of cessation in women, in a Brazilian population sample.

Key words: Tobacco smoking; Public health; Receptors, Dopamine D2; Tobacco use cessation; Polymorphism, genetic

RESUMEN

Objetivo: Investigar la asociación entre un polimorfismo relacionado con los receptores de dopamina (*TaqIA*) y el comportamiento de fumar en una muestra de la población Brasileña. **Métodos:** Este es un estudio transversal, con 449 individuos de ambos sexos, mayores de 18 años. La historia del tabaquismo se obtuvo a través de un cuestionario. Las muestras de sangre se genotiparon para *TaqIA* (*rs1800497*) mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR). Se utilizaron análisis de regresión logística y lineal para verificar el efecto de los genotipos sobre fumar. **Resultados:** 66.4% de los participantes eran Nunca fumadores; el 12,2% Fumadores actuales y el 21,4% Exfumadores. La alelo *T* se asoció con el inicio de fumar más tarde en comparación con *CC* (16.97 vs. 15.09; IC 95%: 15.75-18.19; $p = 0.02$). El alelo *T* también confirió mayor probabilidad de cese en las mujeres (OR = 3.17; IC 95%: 1.06-9.45; $p = 0.04$). No se encontraron diferencias significativas en los hombres. No se observó asociación para el riesgo de convertirse en fumador, CPD, y FTND. **Conclusión:** *TaqIA rs1800497* se asoció con un efecto protector para la edad de inicio del tabaquismo y mayor probabilidad de dejar de fumar en mujeres Brasileñas.

Palabras clave: Tabaquismo, Salud Pública, Receptores de dopamina D2, Cese dal uso de tabaco; Polimorfismo genético.

INTRODUÇÃO

O tabagismo é um grave problema de Saúde Pública, associado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo acidente vascular cerebral, distúrbios pulmonares, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. O fumo de tabaco representa a principal causa de morte evitável no mundo, sendo responsável por 8 milhões de óbitos por ano (WHO, 2020). No Brasil, provoca anualmente mais de 150 mil mortes e configura um alto custo para a economia com despesas médicas, internações e perda de produtividade (PINTO M, et al., 2018).

Apesar do amplo conhecimento dos efeitos adversos para a saúde, a cessação de fumo é um desfecho raro com frequentes recaídas (CDC, 2011; NCCDPHP, 2014; ROCHA EF, et al., 2019; SILVA NBNC, et al., 2019). Estudos mostram que a vulnerabilidade ao tabaco é individual e influenciada por fatores ambientais e genéticos, sendo de aproximadamente 40-75% para iniciação do fumo, 70-80% para persistência e mais de 50% para o sucesso de cessação (LI MD, et al., 2003; MUNAFÓ M, et al., 2004).

Dentre mais de 7000 substâncias químicas aos quais os fumantes de cigarro estão expostos, a nicotina é o principal componente aditivo. Assim como acontece no uso de outras drogas, a nicotina estimula a liberação de dopamina no sistema mesolímbico, que provoca sensação de prazer e recompensa e reforça o comportamento da auto-administração (BENOWITZ NL, 2010; MA Y, et al., 2015; NCCDPHP, 2014).

O gene *DRD2*, que codifica o receptor de dopamina do tipo D2, é um importante componente do sistema de recompensa dopaminérgico, e tem sido associado à susceptibilidade ao tabagismo e outras desordens psiquiátricas (HIRASAWA-FUJITA M, et al., 2017; MA Y, et al., 2015). Os receptores D2 são acoplados à proteína G que inibe a atividade da adenilato ciclase. Nos neurônios pós sinápticos, regulam a propagação do impulso nervoso, enquanto que nos pré-sinápticos têm função de auto-receptores, limitando a liberação de dopamina (DE MEI C, et al., 2009; MA Y, et al., 2015).

Particularmente, um polimorfismo que tem recebido atenção é o *TaqIA* (*rs1800497C>T*), localizado em uma região codificante do gene *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*), adjacente ao *DRD2*. O alelo variante *T* (ou *A1*) do *TaqIA* está relacionado à menor expressão da proteína D2 (MA Y, et al., 2015; NEVILLE MJ, et al., 2004).

Este polimorfismo tem sido associado a características do comportamento tabágico como a iniciação do tabagismo, o grau de dependência nicotínica, o número de cigarros consumidos por dia (CPD) e o sucesso de cessação. Entretanto, as associações não são consistentemente encontradas (CLAGUE J, et al., 2010; GORDIEV M, et al., 2013; MORTON LM, et al., 2006; RADWAN GN, et al., 2007; TOMAZ PRX, et al., 2015). Na população Brasileira, que tem um perfil genético heterogêneo devido à grande miscigenação étnica (LINS et al., 2009), os trabalhos ainda são escassos (MOURA ACM, 2016; TOMAZ PRX, et al., 2015).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a associação entre o polimorfismo *TaqIArs1800497* e a susceptibilidade para o fumo, assim como analisar o efeito nas características do comportamento tabágico como o número de cigarros consumidos por dia, idade de iniciação, grau de dependência nicotínica e cessação em uma amostra da população Brasileira.

MÉTODOS

Este estudo foi do tipo observacional com o delineamento transversal, realizado entre os anos de 2016 e 2019. Em uma amostra de conveniência, a população do estudo foi composta por 449 indivíduos residentes em uma cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Os participantes responderam a um questionário de avaliação dos dados sociodemográficos e o histórico do uso de tabaco. Os critérios de elegibilidade foram ser maiores de 18 anos no momento da entrevista e serem capazes de responder ao questionário. Foram excluídos do estudo indivíduos em quem não foi possível coletar amostra biológica.

Por meio do questionário, os participantes foram classificados quanto ao *status* tabágico em três grupos: Nunca fumantes, Fumantes atuais e Ex-fumantes. Os Nunca fumantes foram definidos como indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos de 100 cigarros durante toda a vida; Fumantes atuais foram indivíduos que fumaram pelo menos 100 cigarros na vida e ainda fumavam regularmente; Ex-fumantes foram aqueles que haviam parado de fumar há pelo menos doze meses.

O risco para o fumo foi avaliado pela comparação entre Nunca fumantes e Fumantes atuais + Ex-fumantes. A idade de iniciação do hábito tabágico e a cessação foram avaliadas entre os Fumantes atuais e Ex-fumantes. O grau de dependência, definido pelo Teste de dependência nicotínica de Fagerstrom (FTND), e o número de cigarros consumidos (CPD) foram analisados entre os Fumantes atuais.

Na mesma ocasião da aplicação do questionário, foram coletadas amostras de sangue de cada participante em tubos com EDTA e armazenados a -80°C até o momento da análise. O DNA usado como molde para a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) foi extraído a partir de 500 µL de sangue total, usando o método baseado na técnica de *Salting-Out* (SAMBROOK J, 2001). Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o espectofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher ScientificTM) e o polimorfismo *TaqIA* foi genotipado pelo sistema de discriminação alélica *TaqMan* (ensaio: *rs1800497*; C_7486676_10), em equipamento de PCR em Tempo Real (Reação em Cadeia da Polimerase) (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) de acordo com os protocolos do fabricante. Para verificar a eficiência da genotipagem, 10% das amostras foram aleatoriamente selecionadas e refeitas. Não houve discrepância dos resultados.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA). Para verificar a normalidade das variáveis foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado pelo teste Qui-quadrado (χ^2). As

variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio-padrão (DP), enquanto as categóricas foram apresentadas por frequências. O Teste de Kruskal-Wallis e o Teste χ^2 foram usados para avaliar diferenças nas médias e frequências.

Os genótipos do *TaqIA rs1800497* foram classificados baseado em estudos prévios (GORDIEV M, et al., 2013; SWAN GE, et al., 2005). Primeiramente, CC foi utilizado como referência para comparação com CT e TT (CC versus CT; CC versus TT). Adicionalmente, devido à baixa frequência de TT, os genótipos foram agrupados pela presença do alelo variante T (CT ou TT versus CC).

O teste de Regressão logística foi utilizado para avaliar a possível associação entre *TaqIA* e o risco para o fumo, considerando o *status* tabágico como variável dependente e ajustado pela idade, sexo, escolaridade (anos de estudo), consumo de álcool (sim/não) e cor da pele (auto declarada). A análise da chance de cessação espontânea do tabagismo (no grupo estudado não houve interferência medicamentosa) também foi realizada por Regressão logística, ajustada pelo sexo, consumo de álcool, cor da pele e idade de iniciação do fumo. As associações entre o polimorfismo e a idade de início, o número de cigarros consumidos por dia (CPD) e o grau de dependência nicotínica segundo Fagerstrom (FTND) foram estimadas pela comparação de médias, com ajuste para possíveis fatores de confundimento, utilizando o modelo de Regressão linear. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi de $p \leq 0,05$.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/ Fundação Oswaldo Cruz (ENSP, FIOCRUZ), com o número CAAE 40514415.0.0000.5240 e parecer número 2.090.482. Os participantes foram informados e esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e a participação foi voluntária atendendo à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS

Dos 449 indivíduos que participaram do estudo, 66,4% eram Nunca fumantes ($n=298$) e 12,2% eram Fumantes atuais ($n=55$) e 21,4% eram Ex-fumantes ($n=96$). A **Tabela 1** apresenta as características sociodemográficas da população do estudo de acordo com o *status* tabágico. A idade variou entre 18 a 87 anos e 68,2% eram mulheres ($n=306$). A maior parte da população se declarou não branca (74,0%), que incluiu pretos, pardos, e descendentes de indígenas e Asiáticos. Entre os Fumantes atuais, 70,9% reportaram consumir bebida alcoólica, enquanto entre os Nunca fumantes e Ex-fumantes, a frequência do uso de álcool foi menor, 40,9% e 42,7%, respectivamente. A renda familiar da maioria dos participantes foi menor do que 3 salários mínimos, que no início da pesquisa era R\$ 937,00 reais. Foram encontradas diferenças significativas para gênero, idade, escolaridade e consumo de álcool ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Características sociodemográficas da população do estudo, $n=449$, 2016-2019.

Variável	Total n (%)	Nunca fumantes n(%)	Fumantes atuais n (%)	Ex- fumantes n (%)	p
Sexo					
Feminino	306 (68,2%)	216(72,5)	31(56,4)	59(61,5)	0,02
masculino	143 (31,8%)	82(27,5)	24(43,6)	37(38,5)	
Idade (média; DP)	51,96 (15,12)	50,37(15,71)	51,02(12,75)	57,45(13,21)	<0,01
Escolaridade (média; DP)	8,59 (3,95)	8,95(3,91)	8,35(3,68)	7,64(4,08)	0,01
Cor da pele¹					
Branco	116 (26,0%)	85(28,7)	9(16,4)	22(23,2)	0,12
Não Branco ²	330 (74,0%)	211(71,3)	46(83,6)	73(76,8)	

Uso de álcool					
Sim	202 (45,0%)	122(40,9)	39(70,9)	41(42,7)	<0,01
Não	247 (55,0%)	176(59,1)	16(29,1)	55(57,3)	
Renda^{2,3}					
Menos de 3	258(69,5)	170(68,5)	31(81,6)	57(67,1)	0,68
De 3 a menos de 5	95(25,6)	65(26,2)	7(18,4)	23(27,1)	
De 5 a menos de 10	15(4,0)	11(4,4)	0(0,0)	4(4,7)	
10 ou mais	3(0,8)	2(0,8)	0(0,0)	1(1,2)	
Total	449	298	55	96	

DP, desvio padrão; p valor obtido pelos Teste Qui-quadrado (χ^2) e Kruskal-Wallis;¹ O valor de n variou devido ao dado faltante (cor da pele n=3; renda n=78);² Pretos, pardos, descendentes de indígenas e Asiáticos;

Fonte: Mota CL, et al., 2020.

A distribuição genotípica de *TaqIA* estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A frequência encontrada foi de 50,6% (n=227) para o CC, 39,6% (n=178) para CT e 9,8% (n=44) para TT. A frequência observada para o alelo variante T foi de 29,6%.

O resultado da associação entre o polimorfismo *TaqIArs1800497* e o risco de ser tabagista foi estimado pela análise de Regressão logística. Foi observada uma pequena diferença nas frequências genotípicas entre os grupos. Os fumantes atuais e Ex-fumantes apresentaram uma menor prevalência do alelo variante T (46,4%), do que os Nunca fumantes (51%), entretanto a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa (CC versus CT/TT: OR= 0,79; 95% IC: 0,52-1,20; p=0,26) (Tabela 2). Também não foi encontrada associação significativa quando se estratificou a amostra pelo sexo (dados não mostrados).

Tabela 2. Associação entre *TaqIA rs1800497* e o risco para o tabagismo, n=449, 2016-2019.

Genótipo	Nunca fumantes (n=298)	Fumantes atuais + Ex-fumantes (n= 151)	OR (IC 95%)	p
	n (%)	n (%)		
CC	146(49,0)	81(53,6)	1 ^a	
CT	123(41,3)	55(36,4)	0,80(0,51-1,24)	0,32
TT	29(9,7)	15(9,9)	0,74(0,35-1,54)	0,42
CT/TT	152(51,0)	70(46,4)	0,79(0,52-1,20)	0,26

OR, odds ratio (razão de chance) ajustada por idade, sexo, escolaridade, consumo de álcool e cor da pele; IC, Intervalo de confiança. p valor obtido por Regressão logística. a, Grupo de referência.

Fonte: Mota CL, et al., 2020.

A Tabela 3 apresenta a análise de Regressão linear para a idade de iniciação, grau de dependência segundo Fagerstrom (FTND) e número de cigarros consumidos por dia (CPD) de acordo com *TaqIA*

rs1800497. O alelo variante *T* foi associado à idade de iniciação do fumo mais tardia, em comparação ao genótipo *CC* (16,97 vs. 15,09; IC 95%: 15,75-18,19; $p=0,02$). Também foi observado que indivíduos heterozigotos *CT* começaram a fumar em média 1,76 anos mais tarde do que *CC* (IC 95%: 15,42-18,28; $p=0,04$). A média de iniciação foi ainda mais alta para portadores do genótipo homozigoto variante *TT*, de 2,31 anos (IC 95%: 14,84-19,96; $p=0,02$). Não foi encontrada associação significativa quando se estratificou a amostra pelo sexo (dados não mostrados). Da mesma forma, FTND e CPD também não foram associados ao polimorfismo ($p>0,05$) (tabela 3).

Tabela 3. Associação entre *TaqIA rs1800497* e características do comportamento tabágico, $n=146$ para Idade de início, $n=51$ para CPD e FTND, 2016-2019.

Genótipo	Idade de início (n=146)			
	n	Média	IC 95%	p
<i>CC</i>	78	15,09	14,21-15,97	1 ^a
<i>CT</i>	53	16,85	15,42-18,28	0,04
<i>TT</i>	15	17,40	14,84-19,96	0,02
<i>CT/TT</i>	68	16,97	15,75-18,19	0,02
Genótipo	Grau de dependência nicotínica segundo Fagerstrom (FTND) (n=51)			
	n	Média	IC 95%	p
<i>CC</i>	30	4,47	3,52-5,41	1 ^a
<i>CT</i>	18	3,83	2,64-5,03	0,35
<i>TT</i>	3	4,33	2,84-11,50	0,92
<i>CT/TT</i>	21	3,90	2,81-5,00	0,40
Genótipo	Número de cigarros consumidos por dia (CPD) (n=51)			
	n	Média	IC 95%	p
<i>CC</i>	30	15,67	12,94-18,39	1 ^a
<i>CT</i>	18	13,50	8,69-18,31	0,37
<i>TT</i>	3	17,00	13,53-47,53	0,89
<i>CT/TT</i>	21	14,00	9,54-18,46	0,38

IC, Intervalo de confiança da média; p valor obtido por Regressão linear. Idade de início: ajustado por sexo e consumo de álcool; FTND (grau de dependência segundo Fagerstrom) e CPD (cigarros por dia): ajustado por sexo, consumo de álcool e idade. a, Grupo de referência.

Fonte: Mota CL, et al., 2020.

A análise da associação entre a cessação do tabagismo e *TaqIA* verificada por meio de Regressão logística mostrou uma probabilidade de cessação 3,17 vezes maior em mulheres portadoras do alelo variante *T* em comparação com *CC* (*CC* versus *CT/TT*; OR= 3,17; 95% IC: 1,06-9,45; $p=0,04$). Na população geral e no grupo masculino não foram encontradas associações significativas ($p>0,05$). Devido à baixa frequência do genótipo variante após a estratificação pelo sexo, a avaliação da cessação foi realizada utilizando o modelo de agrupamento dos genótipos já definido previamente, *CC* versus *CT/TT* (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre *TaqIA rs1800497* e a cessação do tabagismo, n=151, 2016-2019.

População total (n=151)				
Genótipo	Fumantes atuais(n=55)	Ex-fumantes (n=96)	OR(IC 95%)	p
	n (%)	n (%)		
CC	32(58,2)	49(51,0)	1 ^a	
CT/TT	23(41,8)	47(49,0)	2,04(0,94-4,45)	0,07
Mulheres (n= 90)				
	Fumantes atuais(n=31)	Ex-fumantes(n=59)	OR(IC 95%)	p
	n (%)	n (%)		
CC	18(58,1)	28(47,5)	1 ^a	
CT/TT	13(41,9)	31(52,5)	3,17(1,06-9,45)	0,04
Homens (n= 61)				
	Fumantes atuais(n=24)	Ex-fumantes(n=37)	OR(IC 95%)	p
	n (%)	n (%)		
CC	14(58,3)	21(56,8)	1 ^a	
CT/TT	10(41,7)	16(43,2)	1,39 (0,43-4,54)	0,58

OR, odds ratio (razão de chance) ajustada por sexo, consumo de álcool, cor da pele e idade de iniciação do tabagismo; IC, Intervalo de confiança.p valor obtido por Regressão logística.a, Grupo de referência.

Fonte: Mota CL, et al., 2020.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a análise da associação entre o polimorfismo *TaqIA rs1800497* e o comportamento tabágico em uma amostra da população Brasileira. Este polimorfismo tem sido associado à desordens psiquiátricas e ao mecanismo de recompensa relacionado às drogas de abuso, incluindo o álcool e o tabaco (HUANG W, et al., 2009; MA Y, et al., 2015).

Algumas hipóteses são sugeridas para a relação entre o polimorfismo *TaqIA rs1800497* e a susceptibilidade ao tabaco. Pesquisas reportam que portadores do alelo variante *T* do *TaqIA* possuem uma menor expressão da proteína D2 (MA Y, et al., 2015; NEVILLE MJ, et al., 2004). Devido ao papel de autoreceptor desempenhado pela proteína, que limita a taxa de síntese do neurotransmissor, a menor densidade dos receptores D2 estaria relacionada a um maior nível de dopamina sináptica. Desta forma, indivíduos portadores de alelo *T* do *TaqIA* teriam menor necessidade da repetição da estimulação dopaminérgica do que indivíduos que não apresentam a variação polimórfica, sendo portanto, menos susceptíveis à adição a nicotina. Entretanto, a função do *TaqIA* ainda não é completamente elucidada e mais estudos são necessários para compreensão dos mecanismos moleculares (BIDWELL LC, et al., 2015; MOURA ACM, 2016).

A literatura mostra que a prevalência do alelo variante *T* difere entre grupos étnicos. Por exemplo, a frequência é significativamente mais alta em Americanos (53% a 75%) do que em Asiáticos (11% a 58%)

(OHMOTO M, et al., 2013; RADWAN GN, et al., 2007). Sabe-se que o Brasil é um país com população altamente miscigenada (LINS TC, et al., 2009). No presente estudo, a maior parte dos participantes se declararam pretos, pardos, descendentes de indígenas e Asiáticos (74%). A frequência do alelo variante *T* encontrada (29,6%) foi semelhante a observada em pesquisas prévias que também envolviam população Brasileira (MOURA ACM, 2016; TOMAZ PRX, et al., 2015).

A relação entre o polimorfismo *TaqIA rs1800497* e o tabagismo é controversa. Alguns estudos com população Caucasiana sugerem que o alelo *T* está associado ao aumento do risco de se tornar fumante (COMINGS DE, et al., 1997; MORTON LM, et al., 2006; NOBLE EP, et al., 1994; OHMOTO M, et al., 2013), enquanto pesquisas com Japoneses, Poloneses e Russos mostraram um maior risco para o genótipo *CC* (GORDIEV M, et al., 2013; HAMAJIMA N, et al., 2002; OHMOTO M, et al., 2013; SIEMINSKA A, et al., 2009; YOSHIDA K, et al., 2001). No presente estudo, não foi encontrada influência significativa do polimorfismo *TaqIA* para o risco de ser fumante. Entretanto, as frequências genotípicas observadas corroboram com um trabalho anterior, desenvolvido também com uma população Brasileira, que mostrou uma maior frequência do genótipo selvagem *CC* em Fumantes do que em Não fumantes, em comparação ao alelo variante *T* (MOURA ACM, 2016).

A influência de *TaqIA* no comportamento tabágico foi avaliado pela idade de iniciação do hábito, número de cigarros consumidos por dia (CPD) e grau de dependência nicotínica (FTND). Para CPD e FTND não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos de *TaqIA*. Estes achados concordam com alguns estudos (BIDWELL LC, et al., 2015; TOMAZ PRX, et al., 2015; RADWAN GN, et al., 2007) mas conflitam com outros trabalhos que sugerem a influência de *TaqIA rs1800497* no comportamento do tabagismo (CLAGUE J, et al., 2010; DE RUYCK K, et al., 2010; HUANG W, et al., 2009). Esta inconsistência nos resultados pode ser atribuída a alguns fatores, como por exemplo os métodos de classificação do fumo, a estratificação da amostra estudada, e as diferenças étnicas entre as populações (OHMOTO M, et al., 2013; RADWAN DN, et al., 2007). Além desses fatores, no presente estudo, o número de cigarros consumidos por dia e grau de dependência nicotínica foram analisados apenas no subgrupo de fumantes atuais, o que reduziu o tamanho amostral e pode ter enfraquecido o poder estatístico das análises.

Em relação a idade de iniciação do tabagismo, foi observado entre os Fumantes atuais e Ex-fumantes que portadores do alelo variante *T* começaram a fumar aproximadamente 2 anos mais tarde do que indivíduos *CC*. Semelhantemente, outro estudo com amostra Brasileira observou que o alelo variante de *TaqIA rs1800497* tem um efeito protetor na idade de iniciação (MOURA ACM, 2016). Já em Caucasianos, o alelo *T* parece ser fator de risco para iniciação mais precoce (CLAGUE J, et al., 2010; OHMOTO M, et al., 2013; SPITZ MR, et al., 1998). Os resultados aqui discutidos corroboram com a hipótese já sugerida por outros autores sobre a influência das diferenças étnicas na relação entre *TaqIA* e o comportamento do tabagismo (OHMOTO M, et al., 2013).

O estudo também mostrou associação entre o alelo variante *T* de *TaqIA* e maior probabilidade de cessação em mulheres. Este resultado é consistente com pesquisas prévias que observaram que, em comparação com o genótipo selvagem *CC*, indivíduos portadores de pelo menos um alelo variante *T* tinham maior chance de parar de fumar (BREITLING LP, et al., 2010; GORDIEV M, et al., 2013; JOHNSTONE EC, et al., 2004; MORTON LM, et al., 2006; SWAN GE, et al., 2005), embora existam achados discordantes (DAVID SP, et al., 2007; LERMAN C, et al., 2003; TOMAZ PRX, et al., 2015). Quando se analisou a população total e o grupo masculino, não foram encontradas diferenças significativas. Estes resultados sugerem o gênero como um provável fator relevante para a cessação. Várias pesquisas evidenciam que a relação genética-tabagismo difere entre homens e mulheres (OHMOTO M, et al., 2013; PETERSEN N e LONDON ED, 2018; SWAN, et al., 2005). Yudkin P, et al. (2004) confirmam estas evidências, ao observarem uma considerável eficácia no tratamento para cessação com reposição de nicotina em mulheres portadores do alelo variante *T* de *TaqIA*. Nos homens, nenhuma relação significativa entre os genótipos e o tratamento foi observada (YUDKIN P, et al., 2004).

O efeito do *TaqIA rs1800497* na cessação do hábito tabágico também parece ser alterado por interações gene-gene com outras variações polimórficas (JOHNSTONE EC, et al., 2004; LERMAN C, et al., 2003; TON TGN, et al., 2007). Este tipo de investigação foi realizada por Ton TGN, et al. (2007) em uma população com 593 mulheres fumantes de origem caucasiana. Neste estudo, não foi observada associação

entre a probabilidade de cessação e *TaqIA* quando o polimorfismo foi analisado individualmente. Um efeito significativo para *TaqIA* foi encontrado apenas quando analisado concomitantemente com um polimorfismo conhecido como *SLC6A3 VNTR*, presente no gene que codifica a proteína transportadora de dopamina, relacionada a recaptação do neurotransmissor da fenda sináptica. Mulheres portadoras do alelo variante *T* de *TaqIA* e do genótipo de 9 repetições do polimorfismo *SLC6A3* tinham maior probabilidade de parar de fumar em comparação com as outras possibilidades genótípicas.

A principal limitação deste estudo foi o tamanho amostral relativamente pequeno e a amostragem por conveniência. Este tipo de abordagem foi adotada por ser a única possível devido ao acesso restrito à comunidade. O trabalho contribui significativamente para o conhecimento da relação entre variações genéticas no sistema de recompensa dopaminérgico e o comportamento do tabagismo, e se assemelha com resultados de pesquisas com maiores populações. Este estudo é de particular interesse pois envolve a população Brasileira que é altamente miscigenada e pouco estudada. Estudos futuros envolvendo interação gênica e a combinação entre genótipos também são importantes para ajudar no entendimento das bases moleculares da neurobiologia do fumo e contribuir para investigação mais aprofundada da medicina personalizada para a cessação.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o alelo variante *T* do polimorfismo *TaqIA* (*rs1800497*) foi associado com idade de iniciação do fumo mais tardia. Além disso, a variação polimórfica conferiu maior probabilidade de cessação do tabagismo nas mulheres, mostrando que o gênero é um fator de influência para o efeito de *TaqIA* no sucesso do abandono do hábito. Estes achados contribuem com a literatura sugerindo que o polimorfismo *TaqIArs1800497* confere proteção contra o tabagismo na população Brasileira, e pode auxiliar no avanço dos tratamentos para cessação.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela escola de Saúde Pública Sérgio Arouca/ Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ) (ENSP-018-FIO-17) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (E-26/200.618/2018), Brasil.

REFERÊNCIAS

1. BENOWITZ NL. Nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine*, 2010; 362(24): 2295–2303.
2. BIDWELL LC, et al. NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 variants and smoking motives as intermediate phenotypes for nicotine dependence. *Psychopharmacology*, 2015; 232(7):1177–86
3. BREITLING LP, et al. Prospective association of dopamine-related polymorphisms with smoking cessation in general care. *Pharmacogenomics*, 2010; 11(4): 527–536.
4. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Quitting smoking among adults—United States, 2001–2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2011; 60(44): 1513–1519.
5. CLAGUE J, et al. The D2 Dopamine Receptor Gene and Nicotine Dependence Among Bladder Cancer Patients and Controls. *Behavior Genetics*, 2010; 40(1): 49–58.
6. COMINGS DE, et al. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. *Molecular Psychiatry*, 1997; 2(1):44–56.
7. DAVID SP, et al. Pharmacogenetic clinical trial of sustained-release bupropion for smoking cessation. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 2007; 9(8): 821–833.
8. DE MEI C, et al. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009; 9(1): 53–58
9. DE RUYCK K, et al. Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. *Pharmacogenomics*, 2010;11(8):1053–63

10. GORDIEV M, Genetic analysis of polymorphisms in dopamine receptor and transporter genes for association with smoking among cancer patients. *European Addiction Research*, 2013;19(2):105–111.
11. HAMAJIMA N, et al. Association between smoking habits and dopamine receptor D2 taqI A A2 allele in Japanese males: a confirmatory study. *Journal of Epidemiology*, 2002;12(4):297–304.
12. HIRASAWA-FUJITA M, et al. Genetic Variation of the Mu Opioid Receptor (OPRM1) and Dopamine D2 Receptor (DRD2) is Related to Smoking Differences in Patients with Schizophrenia but not Bipolar Disorder. *Clinical Schizophrenia & Related Psychoses*, 2017; 11(1): 39–48
13. HUANG W, et al. Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34(2):319–30
14. JOHNSTONE EC, et al. Genetic variation in dopaminergic pathways and short-term effectiveness of the nicotine patch. *Pharmacogenetics*, 2004; 14(2): 83–90.
15. LERMAN C, et al. Effects of dopamine transporter and receptor polymorphisms on smoking cessation in a bupropion clinical trial. *Health Psychology: Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association*, 2003;22(5):541–548.
16. LI MD, et al. A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction (Abingdon, England)*, 2003; 98(1): 23–31.
17. LINS TC, et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *American Journal of Human Biology*, 2010; 22(2): 187-192.
18. MA Y, et al. The significant association of Taq1A genotypes in DRD2/ANKK1 with smoking cessation in a large-scale meta-analysis of Caucasian populations. *Translational Psychiatry*, 2015; 5(12): e686–e686.
19. MORTON LM, et al. DRD2 genetic variation in relation to smoking and obesity in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: *Pharmacogenetics and Genomics*, 2006;16(12): 901–910.
20. MOURA ACM, 2016. Prevalência do polimorfismo Taq1a no gene do receptor de dopamina do tipo D2 e seus possíveis efeitos em uma população de tabagistas do nordeste do Brasil, PI. *Dissertação (mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba*, 2016; 86 p.
21. MUNAFÒ M, et al. The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 2004;6(4):583–597.
22. NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH (NCCDPHP). *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014; 36P.
23. NEVILLE MJ, et al. Identification and characterization of ANKK1: A novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Human Mutation*, 2004;23(6):540–545...
24. NOBLE EP, et al. D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Medical Hypotheses*, 994; 42(4): 257–260.
25. OHMOTO M, et al. Association Between Dopamine Receptor 2 TaqIA Polymorphisms and Smoking Behavior With an Influence of Ethnicity: A Systematic Review and Meta-Analysis Update. *Nicotine & Tobacco Research*, 2013; 15(3): 633–642.
26. PETERSEN N, LONDON ED. *Addiction and dopamine: sex differences and insights from studies of smoking*. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 2018; 23:150–9.
27. PINTO M, et al. Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos. Documento técnico IECS N° 21. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria, Buenos Aires, Argentina. Maio de 2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/carga-de-doenca-atribuivel-ao-uso-do-tabaco-no-brasil-e-potencial-impacto-do>>. Acesso em: 22 abr. 2020.
28. RADWAN GN, et al. DRD2/ANKK1 TaqI polymorphism and smoking behavior of Egyptian male cigarette smokers. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 2007;9(12):1325–1329

29. ROCHA EF, et al. O cigarro, o narguilé e a doença periodontal. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 2019; (28): e784.
30. SAMBROOK J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 p.
31. SIEMINSKA A, et al. Influences of polymorphic variants of DRD2 and SLC6A3 genes, and their combinations on smoking in Polish population. *BMC medical genetics*, 2009; 10:92.
32. SILVA NBN, et al. Tabagismo como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 2019; (19): e313.
33. SPITZ MR, et al. Case-control study of the D2 dopamine receptor gene and smoking status in lung cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998; 90(5): 358–363.
34. SWAN GE, et al. Dopamine receptor DRD2 genotype and smoking cessation outcome following treatment with bupropion SR. *The Pharmacogenomics Journal*, 2005; 5(1): 21–9.
35. TOMAZ PRX, et al. CYP2B6 rs2279343 polymorphism is associated with smoking cessation success in bupropion therapy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015; 71(9): 1067–73.
36. TON TG, et al. Genetic polymorphisms in dopamine-related genes and smoking cessation in women: a prospective cohort study. *Behavioral and Brain Function*, 2007; 3(1): 22.
37. WORLD HEALTH ORGANIZATION: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Who Report On The Global Tobacco Epidemic 2019: offer help to quit tobacco use*. Geneva: World Health Organization, 2020; 119p.
38. YOSHIDA K, et al. Association between the dopamine D2 receptor A2/A2 genotype and smoking behavior in the Japanese. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2001; 10(4): 403–405.
39. YUDKIN P, et al. Effectiveness of nicotine patches in relation to genotype in women versus men: randomised controlled trial. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2004; 328(7446):989–90.

6.3 TERCEIRO ARTIGO DA TESE

CHRNA5/CHRNA3 polymorphisms and tobacco smoking risk in a Brazilian population sample (publicado em 2020, na revista *GSC Biological and Pharmaceutical Science*)

Este estudo avaliou o efeito dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 no comportamento do tabagismo em uma amostra da população brasileira (Campos Elíseos, Duque de Caxias, RJ) composta por 449 indivíduos de ambos os sexos.



Available online at GSC Online Press Directory

GSC Biological and Pharmaceutical Sciences

e-ISSN: 2581-3250, CODEN (USA): GBPSC2

Journal homepage: <https://www.gsonlinepress.com/journals/gscbps>

(RESEARCH ARTICLE)



CHRNA5/CHRNA3 polymorphisms and tobacco smoking risk in a Brazilian population sample

Caroline de Lima Mota ^{1,*}, Simone Mitri ¹, Cristiane Barata-Silva ² and Josino Costa Moreira ¹¹ Department of Toxicogenetics, Center for Studies of Worker's Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.² Department of Chemistry, Inorganic Contaminants Section, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Publication history: Received on 04 August 2020; revised on 13 August 2020; accepted on 15 August 2020

Article DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.12.2.0253>

Abstract

Tobacco smoking is a major risk factor of several diseases such as lung cancer, stroke, chronic obstructive pulmonary disease and increases the susceptibility to infectious diseases. The understanding of smoking addiction requires phenotyping and genotyping studies. Variations in *CHRNA5/CHRNA3* can alter receptor responses to nicotine and thus interfere with smoking behavior and risk. Therefore, this study aimed to investigate the association of *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 with smoking behavior in a Brazilian population sample, comprising 449 subjects. Smoking data was obtained from a questionnaire. The polymorphisms were genotyped by Polymerase Chain Reaction (PCR). Associations were verified using logistic and linear regression analyses. We found that women with the variant *AA* genotype for *CHRNA5* rs16969968 were at significantly increased risk of smoking, with an OR of 3.09 (95% CI: 1.09-8.76; $p=0.033$). The variant *TT* genotype of *CHRNA3* rs578776 showed protection against smoking and later smoking initiation in the overall population and in women, with an OR of 0.41 (95% CI: 0.19-0.88; $p=0.022$). In conclusion, *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 were associated with increased risk and protective effect against smoking, respectively, in a Brazilian population sample. Gender and recessive homozygosis of the polymorphisms variants resulted in a significant effect regarding the results.

Keywords: Tobacco smoking; Public health; Nicotinic receptors; Genetic polymorphism; *CHRNA* polymorphisms; Smoking behavior.

1. Introduction

Smoking is a worldwide problem Public Health responsible for over 8 million deaths a year. Tobacco use is the leading cause of preventable death and has been associated with an increased risk for several diseases, including cardiovascular diseases, lung disorders, stroke, and several types of cancer [1, 2].

Cigarettes are the main source of tobacco consumption, containing over 7000 different chemical substances [2]. Nicotine is the major tobacco substance that establishes and maintains cigarette smoking dependence [3]. Like other psychostimulants, nicotine modulates dopamine activity in the midbrain, specifically the mesocorticolimbic system, which is involved in feeling pleasure when smoking [3,4].

Nicotine is an acetylcholine agonist that binds to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). These receptors are formed by subunits and are distributed in the central and peripheral nervous system, as well as other tissues such as muscle and the endothelium. The arrangement between subunits results in receptors differentially distributed throughout the

* Corresponding author: Mota Caroline de Lima
Department of Toxicogenetics, Center for Studies of Worker's Health and Human Ecology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

body and presenting differential pharmacological properties and responses to nicotine stimulation. Repeated exposure to nicotine can decrease nAChRs responses, leading to their desensitization [5,6]. Consequently, increased nicotine consumption is required to maintain the same response linked to dopamine effects [4]. Some of these receptors are codified by the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster on chromosome 15q25.1, which contains single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with nicotinic dependence [7,8]. These SNPs include *CHRNA5* rs16969968 *G>A*, and *CHRNA3* rs578776 *C>T*, both associated with smoking behavior characteristics, such as number of cigarettes a day (CPD) [9,10,11], age of smoking initiation [12,13], dependence degree as defined by the Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) [13,14], number of quitting attempts [15,16], smoking cessation [17,18] and heavy smoking [19,20].

Variants in these genes that encode proteins related to nicotine addiction in some mestizo population are associated with cigarette smoking and prevalence of tobacco-related diseases [21]. Apparently, this is the case of Brazil, a country characterized by having a mixed population. However, very few studies have been carried out in the Brazilian population [22,23].

According to Vigitel Brasil 2019, in Brazil, the frequency of adult smokers was 9.8%, being higher in males (12.3%) than in females (7.7%) and a frequency of passive smokers at home was 6.8%, being similar between men and women [24]. Although smoking prevalence has decreased in Brazil due to the actions of the National Tobacco Control Policy, tobacco use is still responsible for 156.216 deaths per year, representing high social and economic costs for the country [24,25]. 74% of deaths caused by chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 16% of deaths from heart diseases, 13% from stroke, and 78% from lung cancer are due to the consumption of tobacco. Annual costs with smoking reach up to R\$ 56.9 billion in Brazil, of which R\$ 39.394.369.233 are spent directly on the treatment of related diseases, and R\$ 17.503.786.333 with consequent associated loss of productivity [25]. In this context, this study aimed to investigate potential associations between the *CHRNA5* rs16969968 *G>A* and *CHRNA3* rs578776 *C>T* variants, smoking status risk, and smoking behavior characteristics in a Brazilian population sample.

2. Material and methods

2.1. Study design and population

A total of 449 subjects from Duque de Caxias city in Rio de Janeiro, Brazil, were enrolled in a cross-sectional study with between 2016 and 2019 by a convenience sampling. The study was open to participation by both male and female individuals over 18 years old. The study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Sergio Arouca National School of Public Health (ENSP) ethical committee, number CAAE 40514415.0.0000.5240. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. The participants were interviewed by trained personnel, and a questionnaire was applied to obtain general information, including demographic characteristics.

2.2. Smoking status

Smoking status was defined based on available self-report questionnaire data. According to the smoking status, study participants were classified into never, current and former smokers. Current smokers had smoked at least 100 cigarettes during their lifetime, never smokers had smoked less than 100 cigarettes or had never smoked regularly, and former smokers had quit smoking for ≥ 1 year at the time of interview. The FTND was used to assess the nicotine dependence degree in Current smokers [26]. The risk of smoking was evaluated between Never smokers and Ever smokers (Current and Former smokers). Age of initiation and CPD were also evaluated as smoking behavior among Ever smokers.

2.3. Genotyping

Approximately 5 ml. of blood samples were collected from each study participant, and stored under refrigeration until DNA extraction, carried out by the salting-out method from whole blood. After extraction, the genomic DNA amount was assessed at 260 nm and DNA quality was evaluated through the 260/280 nm ratio using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). SNPs were determined using TaqMan single nucleotide polymorphism Genotyping Assays (assay IDs: rs16969968; C_26000428_20; rs578776; C_721253_10), whose amplifications were conducted according to the manufacturer's instructions and performed on a 7500 real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) platform (Applied Biosystems). In order to verify genotyping efficiency, random samples were selected and re-genotyped for each SNP (10% of all samples).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS statistical software package 20.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc., Chicago, IL, USA). Data normality distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables were presented as means and standard deviation (SD), while categorical data were expressed as frequencies. The Mann-Whitney U-test and χ^2 -test were used to evaluate differences between means and frequencies.

Possible associations between *CHRNA3* rs578776 and *CHRNA5* rs16969968 SNPs with risk of smoking was assessed by applying a logistic regression, considering smoking status as the dependent variable and age, gender, skin color (white/non-white; auto-declared), years of education and current alcohol consumption (yes/no) as covariates in the modeling. Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals were calculated and a linear regression test was used to access the association between polymorphisms and FTND, age of initiation, and CPD (95% CI). Alcohol consumption and gender were used as covariates for FTND and age of initiation, and age was included for CPD. The significance level for all tests was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

Table 1 presents the sociodemographic characteristics of the study population according to smoking status. From a total of 449 individuals, 33.6% were ever smokers, comprising current (n=55) and former smokers (n=96). Significant differences were detected for gender ($p=0.006$), age (0.003), years of education (0.002) and alcohol use (0.015). Age ranged from 18 to 87 years old. Most of the study population (74%) auto-declared themselves as non-white, including black, medium brown, Asian, and indigenous.

Table 1 Sociodemographic characteristics of the study population.

Variables	Total (n=449) n (%)	Never Smokers (n=298) n (%)	Ever Smokers (n= 151) n (%)	p
Gender				
Female	306 (68.2%)	216 (72.5%)	90 (59.6%)	0.006
Male	143 (31.8%)	82 (27.5%)	61 (40.4%)	0.002
Age (years mean; SD)	51.96 (15.12)	50.37 (15.71)	55.11 (13.37)	0.003
Education (years mean; SD)	8.59 (3.95)	8.95 (3.91)	7.89 (3.94)	0.002
Skin color ¹				
White	116 (26.0%)	85 (28.7%)	31 (20.7%)	0.067
Non-white ²	330 (74.0%)	211 (71.3%)	119 (79.3%)	
Alcohol consumption				
Yes	202 (45.0%)	122 (40.9%)	80 (53.0%)	0.015
No	247 (55.0%)	176 (59.1%)	71 (47.0%)	

SD: standard deviation; p value obtained by Chi-squared (χ^2) test and Mann-Whitney U test.
1 Missing skin color (n=3); 2 Black, medium brown, Asian, and indigenous.

The following genotype frequencies of each SNP in the population were noted: *CHRNA3* rs578776- 33.2% (CC), 44.1% (CT), 22.7% (TT), and *CHRNA5* rs16969968 - 59.9% (GG), 32.5% (GA), and 7.6% (AA). The association of each polymorphism with smoking risk is displayed in Table 2. The applied logistic regression indicated that SNP *CHRNA5* rs16969968 was associated with an increased risk of smoking in women carrying the AA genotype (OR: 3.09; 95% CI: 1.09-8.76). In the recessive model (AA vs AG + GG), women with the AA genotype also exhibited a higher risk for smoking than the GG + GA genotype (OR: 2.88; 95% CI: 1.08-7.71). Conversely, the homozygous variant genotype TT for *CHRNA3* rs578776 was significantly protective regarding the risk of smoking in the total study population, with an OR of 0.48 (95% CI: 0.26-0.89). When the recessive model (TT vs CT + CC) was applied, decreased risks were also observed in homozygous individuals for the variant TT genotype (OR: 0.9; 95% CI: 0.35-0.99). A similar protective effect was observed in women presenting the TT *CHRNA3* rs578776 genotype in comparison with the CC genotype (OR: 0.41; 95% CI: 0.19-0.88), and when the recessive modeling was applied (OR: 0.51; 95% CI: 0.26-0.98).

Table 2 Association between genotypes and risk of smoking.

Genotype	Total study population (n=449)				Women (n=306)				Men (n=143)			
	Never (298)	Ever (151)	OR (95% CI)	<i>P</i>	Never (216)	Ever (90)	OR (95% CI)	<i>P</i>	Never (82)	Ever (61)	OR (95% CI)	<i>P</i>
rs16969868 (CHRNA5)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
<i>GG</i>	176(59.1)	93(61.6)	1 ^a		136(63.0)	58(64.4)	1 ^a		40(48.8)	35(57.4)	1 ^a	
<i>GA</i>	103(34.6)	43(28.5)	0.79 (0.50-1.27)	0.344	69(31.9)	23(25.6)	0.93 (0.51-1.70)	0.823	34(41.5)	20(32.8)	0.61 (0.28-1.38)	0.238
<i>AA</i>	19(6.4)	15(9.9)	1.79 (0.80-4.03)	0.157	11(5.1)	9(10.0)	3.09 (1.09-8.76)	0.033	8(9.8)	6(9.8)	1.08 (0.28-4.16)	0.912
<i>GG+GA</i>	279(93.6)	136(90.1)	1 ^a		205(94.9)	81(90.0)	1 ^a		74(90.2)	55(90.2)	1 ^a	
<i>AA</i>	19(6.4)	15(9.9)	1.92 (0.90-4.14)	0.093	11(5.1)	9(10.0)	2.88 (1.08-7.71)	0.035	8(9.8)	6(9.8)	1.33 (0.37-4.76)	0.661
rs578776 (CHRNA3)	N (%)	N (%)			N (%)	N (%)			N (%)	N (%)		
<i>CC</i>	93(31.2)	56(37.1)	1 ^a		62(28.7)	33(36.7)	1 ^a		31(37.8)	23(37.7)	1 ^a	
<i>CT</i>	130(43.6)	68(45.0)	0.80 (0.50-1.26)	0.344	98(45.4)	42(46.7)	0.73 (0.41-1.30)	0.290	32(39.0)	26(42.6)	1.00 (0.44-2.30)	0.998
<i>TT</i>	75(25.2)	27(17.9)	0.48 (0.26-0.89)	0.019	56(25.9)	15(16.7)	0.41 (0.19-0.88)	0.022	19(23.2)	12(19.7)	0.59 (0.20-1.71)	0.329
<i>CC+CT</i>	223(74.8)	124(82.1)	1 ^a		160(74.1)	75(83.3)	1 ^a		63(76.8)	49(80.3)	1 ^a	
<i>TT</i>	75(25.2)	27(17.9)	0.9 (0.35-0.99)	0.045	56(25.9)	15(16.7)	0.51 (0.26-0.98)	0.043	19(23.2)	12(19.7)	0.69 (0.28-1.72)	0.426

OR = odds ratio adjusted by age, gender, alcohol consumption, years of education and skin color; CI = Confidence Interval; a Reference group; p-value obtained by a logistic regression.

Table 3 Polymorphism association with age of smoking initiation.

	Total study population (n=146)				Women (n=88)				Men (n=58)			
	n	Mean	95% CI	<i>p</i>	n	Mean	95% CI	<i>p</i>	n	Mean	95% CI	<i>p</i>
rs16969868 (<i>CHRNA5</i>)												
<i>GG</i>	89	16.49	15.46-17.53	1 ^a	56	17.00	15.43-18.53	1 ^a	33	15.64	14.57-16.70	1 ^a
<i>GA</i>	43	15.33	14.15-16.50	0.463	23	14.52	12.89-16.15	0.177	20	16.25	14.51-17.99	0.233
<i>AA</i>	14	14.57	12.31-16.83	0.297	9	15.44	12.34-18.55	0.657	5	13.00	8.61-17.39	0.269
<i>GG+GA</i>	132	16.11	15.32-16.91	1 ^a	79	16.28	15.08-17.47	1 ^a	53	15.87	14.96-16.77	1 ^a
<i>AA</i>	14	14.57	12.31-16.83	0.357	9	15.44	12.34-18.55	0.854	5	13.00	8.61-17.39	0.308
rs578776 (<i>CHRNA3</i>)												
<i>CC</i>	54	15.17	14.03-16.30	1 ^a	32	15.56	13.84-17.29	1 ^a	22	14.59	13.25-15.94	1 ^a
<i>CT</i>	68	16.03	14.95-17.11	0.340	42	15.83	14.31-17.36	0.790	26	16.35	14.85-17.84	0.397
<i>TT</i>	24	17.58	15.30-19.87	0.048	14	18.71	14.92-22.51	0.040	10	16.00	14.00-18.00	0.559
<i>CC+CT</i>	122	15.65	14.87-16.42	1 ^a	74	15.72	14.60-16.83	1 ^a	48	15.54	14.53-16.56	1 ^a
<i>TT</i>	24	17.58	15.30-19.87	0.067	14	18.71	14.92-22.51	0.050	10	16.00	14.00-18.00	0.303

CI = Confidence Interval; ^a Reference group; *p*-value obtained by a linear regression adjusted by gender and alcohol consumption.

Table 3 presents the linear regression analysis for age of smoking initiation according to the *CHRNA3* rs578776 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms in the overall study population and in women subjects. The *TT* genotype for *CHRNA3* rs578776 was associated with later initiation in comparison to the *CC* genotype (mean= 18.71; 95% CI: 14.92-22.51; $p= 0.04$), and overall population (mean= 17.58; 95% CI: 0.19-0.88; $p= 0.05$). Individuals homozygous for the *T* allele began smoking about two and three years later than allele *C* homozygous subjects in the overall study population and in women subjects, respectively (Figure 1). No significant difference was noted for men. Regarding FTND and CPD, the linear regression analysis results indicated no association with *CHRNA3* polymorphisms. For the *CHRNA5* (rs16969968) SNP, a lower mean age of initiation for the *AA* genotype compared to *GG* and *AG* genotypes was observed, albeit non-statistically significant, as displayed in Table 3. Likewise, FTND score and CPD were not associated to SNPs (data not shown).

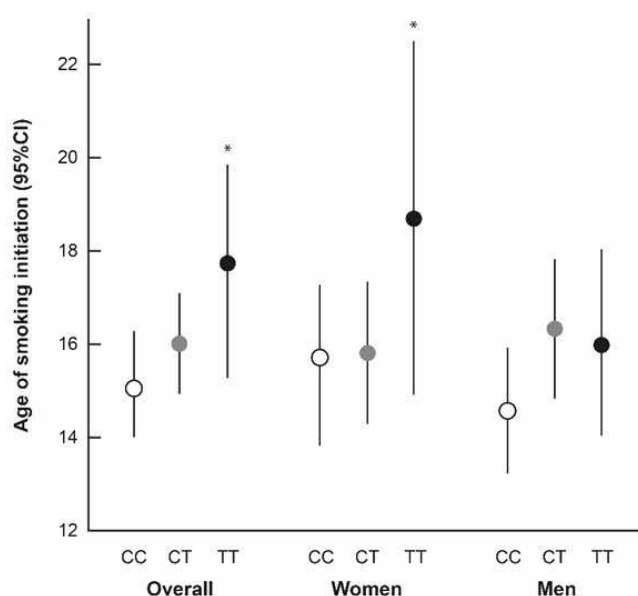


Figure 1 Age of smoking initiation among genotypes for *CHRNA3* rs578776.

Mean age of smoking initiation is presented at a 95% confidence interval (CI), using *CC* as reference in the regression analysis. * p value was ≤ 0.05 .

4. Discussion

Possible associations between *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 SNPs and the risk of smoking and smoking behavior in a Brazilian population were evaluated, since these SNPs have been linked to interindividual variability concerning nicotine responses. *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776, have been investigated as candidates of genetic factors for risk of smoking susceptibility and protection, respectively.

The distribution of variant SNP alleles varies according to population ethnicity. For *CHRNA5* rs16969968, the frequencies of allele *A* are higher in Europeans/Caucasians, at approximately 42%, and lower in Asians and Africans descendants, ranging from 0 to 3% [12,27,28,29]. The inverse is noted for *CHRNA3* rs578776. The presence of allele *T* is lower in Caucasians (24%), and higher in African descendants (80%) and Asians (65%) [29]. The Brazilian population is known to be highly mixed, due to the presence of diverse ethnicities in its establishment [30]. In the present study, most of the participants reported themselves as black, medium brown, indigenous or Asians (74%). Herein, variant allele frequencies were 24% and 45% for *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776, respectively. This distribution appears to be intermediary compared to other populations, and similar to previous studies performed on Brazilian populations [22,23].

The *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 SNPs were shown to influence smoking risks, with their recessive genotypes indicating a higher risk of smoking for *CHRNA5* rs16969968, and protective effect for *CHRNA3* rs578776. An association between the *TT* genotype of *CHRNA3* rs578776 and later initiation age in the overall population was also verified, particularly in women, but not in men. These results are in accordance with previous studies carried out in Caucasian populations [14,28,31,32,33]. No investigations regarding increased risk or protection against smoking in Brazilian population have been conducted for *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776. In addition, few molecular mechanism propositions for these effects are available in literature. For the *CHRNA5* rs16969968 variant allele *A*, a possible explanation is that an amino acid replacement in the receptor caused by the *G>A* variation in the gene appears to decrease receptor responses to nicotine, leading to an increased need for consumption [28]. With regard to *CHRNA3* SNP, however, no plausible explanation for its protective effect has been postulated.

In the present study, gender was proven to be a relevant factor, which should be taken into account in other investigations on genetic variability associated to smoking. The *CHRNA3* rs578776 variant was associated to protection against smoking in the overall population and in women, but not in men. The same was noted for the *CHRNA5* rs16969968 variant, only associated with increased risk of smoking in women. Some authors have suggested that women tend to evolve from experimentation to addiction more quickly and have greater difficulty in quitting smoking [34,35]. Additionally, they are more susceptible due to hormonal differences [36]. Several studies providing evidence of gender influence on the genetic-smoking relationship are available [9,11,35]. Interestingly, as association between the assessed SNPs and smoking was only observed for the homozygous variant genotypes, in accordance to other reports for European populations [28,32,37].

FTND, CPD, and initiation were evaluated as smoking behavior characteristics associated to the *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 polymorphisms among ever smokers. A significant association was observed for initiation, but not with FTND and CPD, probably due to the reduced sample size of ever smokers. Subjects homozygote for the *C* variant of *CHRNA3* rs578776 began smoking 2 years earlier than those presenting the *TT* genotype. This indicates that the *CHRNA3* rs578776 variant has a protective effect on age of smoking initiation in the overall population, which is stronger in women. Even with no statistically significant difference, subjects with *CHRNA5* rs16969968 variant *AA* genotype started smoking about 2 years earlier than those presenting other genotypes. Although few studies focusing on the interference of genetic variations in smoking initiation of smoking are available, the findings reported herein were in accordance with other assessments [12–14,37,38], who reported that people who began smoking earlier exhibited a greater risk of smoking dependence. Weiss et al. only observed an association between *CHRNA5* rs16969868 *AA* and *CHRNA3* rs578776 *TT*, established risk and protection genotypes, respectively, and smoking dependence in adults who began smoking up to 16 years old [14].

The major limitation of this study comprises the inability to assess a possible combined effect of the risk *CHRNA5* rs16969968 SNP and protective *CHRNA3* rs578776 SNP on smoking, due to an insufficient sample size. This could indicate whether the homozygous variant genotype *TT* *CHRNA3* rs578776 may minimize increased smoking risks associated to the *CHRNA5* rs16969968 variant, and may have been the reason for the lack of association between the evaluated SNPs and FTND and CPD.

5. Conclusion

In conclusion, the *CHRNA5* (rs16969968) variant was only associated with a higher risk of smoking in women, while the *CHRNA3* (rs578776) variant was associated with a protective effect regarding risk of smoking and with age of smoking initiation in both the overall study population and in women. For both SNPs, the association was only statistically significant in subjects with variant homozygote genotypes, i.e., the presence of one copy of the allele variant did not affect smoking. Gender influenced the effects of the *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 polymorphisms on smoking. This study contributes to elucidate the influence of the *CHRNA5* rs16969968 and *CHRNA3* rs578776 variants on smoking, especially in the Brazilian population, and may aid in advancing smoking cessation treatments.

Compliance with ethical standards

Acknowledgments

This study was supported by Sergio Arouca National School of Public Health/Oswaldo Cruz Foundation (ENSP/FIOCRUZ) (ENSP-018-FIO-17) and the Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) (E-26/200.618/2018), Brazil.

Disclosure of conflict of interest

There is no conflict of interest in publishing the present data of the study.

Statement of informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- [1] World Health Organization. (WHO). (2019). Who report on the global tobacco epidemic 2019: Offer Help to Quit Tobacco Use. World Health Organization, Geneva, 18-19.
- [2] National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health (NCCDPHP). (2014). The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 1-7.
- [3] Benowitz NL. (2010). Nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine*, 362(24), 2295-2303.
- [4] Nestler EJ. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, 8(11), 1445-1449.
- [5] Improgo MRD, Scofield MD, Tapper AR and Gardner PD. (2010). From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. *Oncogene*, 29(35), 4874-4884.
- [6] Schmidt HD, Rupprecht LE and Addy NA. (2018). Neurobiological and Neurophysiological Mechanisms Underlying Nicotine Seeking and Smoking Relapse. *Molecular Neuropsychiatry*, 4(4), 169-189.
- [7] Li MD. (2018). Involvement of Variants in Gene Clusters CHRNA5/A3/B4 on Chromosome 15 to Smoking Behaviors and Lung Cancer. In: *Tobacco Smoking Addiction: Epidemiology, Genetics, Mechanisms, and Treatment*. Springer, Singapore, 47-69.
- [8] Yang J and Li MD. (2016). Converging findings from linkage and association analyses on susceptibility genes for smoking and other addictions. *Molecular Psychiatry*, 21(8), 992-1008.
- [9] Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, Chabrier A, Hung RJ, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, McLaughlin J, Liu G, Skorpens F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Study E, Benhamou S, Iagiou P, Holcátová I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Castellsagué X, Macfarlane TV, Barzan L, Canova C, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Curado MP, Koifman S, Eluf-Neto J, Matos E, Menezes A, Fernandez L, Metspalu A, Heath S, Lathrop M and Brennan P. (2010). Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals. *International Journal of Epidemiology*, 39(2), 563-577.
- [10] Sieminska A, Jassem E and Kita-Milczarska K. (2015). Nicotine dependence in an isolated population of Kashubians from North Poland: a population survey. *BMC Public Health*, 15(1), 80.
- [11] Conlon MS and Bewick MA. (2011). Single Nucleotide Polymorphisms in CHRNA5 rs16969968, CHRNA3 rs578776, and LOC123688 rs8034191 Are Associated with Heaviness of Smoking in Women in Northeastern Ontario, Canada. *Nicotine and Tobacco Research*, 13(11), 1076-1083.
- [12] Zhu AZX, Renner CC, Hatsukami DK, Benowitz NL and Tyndale RF. (2013). CHRNA5-A3-B4 genetic variants alter nicotine intake and interact with tobacco use to influence body weight in Alaska Native tobacco users: CHRNA5-A3-B4 in Alaska Native people. *Addiction*, 108(10), 1818-1828.
- [13] Buczkowski K, Sieminska A, Linkowska K, Czachowski S, Przybylski G, Jassem E and Grzybowski T. (2015). Association between Genetic Variants on Chromosome 15q25 Locus and Several Nicotine Dependence Traits in Polish Population: A Case-Control Study. *BioMed Research International*, 350348.
- [14] Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausen A, Dunn DM, Matsunami N, Singh NA, Baird L, Coon H, McMahon WM, Piper ME, Fiore MC, Scholand, Connett JE, Kanner RE, Gahring LC, Rogers SW, Hoidal JR and Leppert MF. (2008). A Candidate Gene Approach Identifies the CHRNA5-A3-B4 Region as a Risk Factor for Age-Dependent Nicotine Addiction. *PLoS Genetics*, 4(7), e1000125.
- [15] Erlich PM, Hoffman SN, Rukstalis M, Han JJ, Chu X, Linda Kao WH, Gerhard GS, Stewart WF and Boscarino JA. (2010). Nicotinic acetylcholine receptor genes on chromosome 15q25.1 are associated with nicotine and opioid dependence severity. *Human Gene*, 128(50), 491-499.

- [16] Belsky DW, Moffitt TE, Baker TB, Biddle AK, Evans JP, Harrington H, Houts R, Meier M, Sugden K, Williams B, Poulton R and 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.
- [17] Chuang Y-H, Paul KC, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Bordelon YM and Ritz B. (2019). Genetic variants in nicotinic receptors and smoking cessation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 62, 57-61.
- [18] Wang Q, Li S, Pan L, Li H, Yang X, Jiang F, Zhang N and Han M and Jia C. (2016). Association between variants in nicotinic acetylcholine receptor genes and smoking cessation in a Chinese rural population: Association of Genes with Smoking Cessation. *The American Journal on Addictions*, 25(4), 297-300.
- [19] Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, Yeager M, Jacobs K, Landi MT, Ziegler RG, Chanok S, Kraft P, Bergen AW, Chen C, Wheeler W, Hunter DJ and Hankinson SE. (2009). Genome-Wide and Candidate Gene Association Study of Cigarette Smoking Behaviors. *PLoS ONE*, 4(2), e4653.
- [20] Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, Thun MJ, Goate A and Calle EE. (2008). Nicotinic Receptor Gene Variants Influence Susceptibility to Heavy Smoking. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(12), 3517-3525.
- [21] Pérez-Rubio G, Córdoba-Lanús E, Cupertino P, Cartujano-Barrera F, Campos MA and Falfán-Valencia R. (2019). Role of Genetic Susceptibility in Nicotine Addiction and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Revista de Investigación Clínica*, 71(1), 36-54.
- [22] Tomaz PRX, Santos JR, Scholz J, Abe TO, Gaya PV, Negrão AB, Kreger JE, Pereira AC and Santos PCJL. (2018). Cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit polymorphisms are associated with smoking cessation success in women. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 19(1), 55.
- [23] Silva MR, Gattás GJF, Antonio J, Firigato I, Curioni OA and Gonçalves F de T. Polymorphisms of CHRNA3 and CHRNA5: Head and neck cancer and cigarette consumption intensity in a Brazilian population. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(12), e998.
- [24] Brazil Ministry of Health, Secretariat of Health Surveillance, Department of Health Analysis and Surveillance of Noncommunicable Diseases. (2020). *Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores e risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Ministério da Saúde, Brasília, 27-36.
- [25] Pinto M, Bardac A, Palacios A, Bin A, Alcaraz A, Rodríguez B and Augustovski F e Pichon-Riviere A. (2017). Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Documento técnico IECs N° 21. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria, Buenos Aires, 19-22.
- [26] Sales MPU, Araújo AJ de, Chatkin JM, Godoy I, Pereira LFF, Castellano MVC de O, Tanni SE, Almeida AA, Chatkin G, Silva LCC, Gonçalves CMC, Botelho C, Santos UP, Viegas CA de A, Sestelon MR, Meireles RHA, Correa PCRP, Oliveira MEM, Reichert J, Lima MS and Silva CAR. (2019). Update on the approach to smoking in patients with respiratory diseases. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 45(3), e20180314.
- [27] Robinson JD, Versace F, Lam CY, Minnix JA, Engelmann JM, Cui Y, Karam-Hage M, Shete SS, Tomlinson GE, Chen TTL, David WW, Charles EG and Cincipirini PM. (2013). The CHRNA3 rs578776 Variant is Associated with an Intrinsic Reward Sensitivity Deficit in Smokers. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 114.
- [28] Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone N, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, Horton WL, Breslau N, Budde J, Cloninger CR, Dick DM, Foroud T, Hatsukami D, Hesselbrock V, Johnson EO, Karter J, Kuperman S, Madden PAF, Mayo K, Nurnberger J, Pomerleau O, Porjesz B, Reyes O, Schuckit M, Swan G, Tischfield JA, Edenberg HJ, Rice JP and Goate AM. (2008). Variants in Nicotinic Receptors and Risk for Nicotine Dependence. *American Journal of Psychiatry*, 165(9), 1163-1171.
- [29] Bierut LJ. (2009). Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, 104 (Suppl 1), S64-69.
- [30] Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D and Pereira RW. (2009). Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *American Journal of Human Biology*, 22(2), 187-192.
- [31] Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, Grucza RA, Sun L, Duan W, Budde J, Culverhouse RC, Fox L, Hinrichs AL, Steinbach JH, Wu M, Rice JP, Goate AM and Bierut LJ. (2009). The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 Nicotinic Receptor Subunit Gene Cluster Affects Risk for Nicotine Dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*, 69(17), 6848-6856.

- [32] Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau O, Swan GE, Goate AM, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, Fugman D, Martin NG, Montgomery GW, Wang JC, Ballinger DG, Rice JP and Bierut LJ. (2007). Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Human Molecular Genetics*, 16(1), 36-49.
- [33] Hubacek JA, Pankova A, Stepankova I, Zvolaska K, Adamkova V, Lanska V and Kralikova E. (2017). SNPs within CHRNA5-A3-B4 and CYP2A6/B6 are associated with smoking dependence but not with tobacco dependence treatment outcomes in the Czech population. *Gene*, 606, 35-38.
- [34] Smith PH, Bessette AJ, Weinberger AH, Sheffer CE and McKee SA. (2016). Sex/gender differences in smoking cessation: A review. *Preventive Medicine*, 92, 135-140.
- [35] Petersen N and London ED. (2018). Addiction and dopamine: sex differences and insights from studies of smoking. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 23, 150-159.
- [36] Park SJ, Yi B, Lee HS, Oh WY, Na HK, Lee M and Yang M. (2016). To quit or not: Vulnerability of women to smoking tobacco. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(1), 33-56.
- [37] Rodriguez S, Cook DG, Gaunt TR, Nightingale CM, Whincup PH and Day IN. (2011). Combined analysis of CHRNA5, CHRNA3 and CYP2A6 in relation to adolescent smoking behaviour. *Journal of Psychopharmacology*, 25(7), 915-923.
- [38] Grucza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, Bucholz K, Cloninger CR, Neuman RJ, Budde JP, Fox L, Bertelsen S, Kramer J, Hesselbrock V, Tischfield J, Nurnberger Jr, Almasy L, Porjesz B, Kuperman S, Schuckit MA, Edenberg HJ, Rice JP, Goate AM and Bierut LJ. (2008). A Risk Allele for Nicotine Dependence in CHRNA5 Is a Protective Allele for Cocaine Dependence. *Biological Psychiatry*, 64(11), 922-929.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do conhecimento sobre os efeitos adversos para a saúde, o número de fumantes pelo mundo ainda é grande. Devido ao impacto social e econômico gerado pelo consumo de cigarros, existe um grande interesse sobre os mecanismos que envolvem o comportamento adictivo. Assim, estudos que busquem o entendimento das bases moleculares da adicção e seu potencial para uso como ferramenta de combate ao fumo, são alvos de perspectivas futuras para prevenção e tratamento de cessação do tabagismo. Neste sentido, esta tese foi desenvolvida com o intuito de contribuir para o conhecimento sobre os fatores genéticos associados ao comportamento do tabagismo.

Este trabalho corrobora com a literatura, mostrando que os principais genes relacionados à susceptibilidade ao tabagismo são aqueles envolvidos no sistema de recompensa dopaminérgico cerebral. Além disso, as combinações entre genótipos de diferentes polimorfismos se destacaram, reforçando que interações gênicas são capazes de determinar um perfil genético de susceptibilidade e manutenção da dependência. A ampla pesquisa realizada, com base em artigos científicos, mostra que variações genéticas relacionadas à neurobiologia do tabagismo influenciam nas diferenças interindividuais do comportamento tabágico.

Tendo em vista o caráter multifatorial do tabagismo, esta tese descreveu algumas características sociodemográficas da população do estudo. Como já era esperado para uma população brasileira do Rio de Janeiro, a maior parte dos participantes do estudo se auto declarou não branca. Além disso, neste estudo foi confirmada a relação entre o consumo de álcool e o hábito tabágico, uma vez que a maior parte dos Fumantes atuais consumiam bebida alcoólica, enquanto o consumo entre os Nunca fumantes e Ex-fumantes foi menor.

Devido ao caráter psicoativo da nicotina e seu efeito sobre o sistema de recompensa cerebral dopaminérgico, os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 e *TaqIA* rs1800497 foram investigados neste trabalho.

Em relação polimorfismo *TaqIA* rs1800497, foi observado que a presença de um alelo variante estava associada com a idade de início do tabagismo mais tardia. O alelo variante também foi associado a uma maior chance de cessação, porém este resultado foi observado apenas nas mulheres. A prevalência deste polimorfismo é bastante variável em diferentes populações e seu efeito parece variar de acordo com as etnias. Os dados encontrados sugerem

que o polimorfismo *TaqIA* rs1800497 está associado a um efeito protetor para idade de iniciação do tabagismo e maior probabilidade de cessação em mulheres na amostra da população brasileira estudada.

Os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 mostraram efeitos opostos no estudo. Enquanto o genótipo variante do *CHRNA5* estava associado ao risco para o tabagismo, para *CHRNA3* estava associado à proteção. O genótipo variante do *CHRNA3* também foi associado a idade de iniciação do fumo de tabaco na população total, e particularmente quando analisamos as mulheres. No estudo, apenas uma cópia dos alelos variante de cada polimorfismo não foi capaz de determinar risco ou proteção para o tabagismo. O efeito da variação polimórfica foi observado apenas quando em duas cópias do gene, concordando com estudos prévios.

Corroborando com a literatura existente, os artigos desenvolvidos a partir desta tese mostraram que o gênero e a etnia são fatores que interferem no efeito dos polimorfismos sobre a susceptibilidade ao tabagismo. Estas características devem ser consideradas nos estudos que abordam a influência tanto de fatores ambientais, como genéticos. É importante ressaltar que na população brasileira, que tem um perfil miscigenado e heterogêneo, os estudos ainda são escassos. O presente trabalho contribui com a literatura científica sobre o efeito dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e *CHRNA3* rs578776 e *TaqIA* rs1800497 no comportamento do tabagismo em brasileiros.

A população que compõem esta tese foi formada por amostragem de conveniência, devido ao acesso restrito à comunidade, o que representa uma limitação do estudo. Outra questão foi o número de indivíduos participantes, que se tornou reduzido após a estratificação para realização de algumas análises. Desta forma, são necessários estudos com amostras maiores a fim de confirmar os resultados encontrados neste trabalho. Por outro lado, esta tese apresentou contribuições significativas, principalmente pela inclusão de uma população miscigenada e pouco estudada.

Por fim, considerando o cigarro como uma fonte de exposição a diversas substâncias químicas, este trabalho contribui para identificação do perfil de vulnerabilidade que a população que compôs o estudo está exposta, visto que se trata de uma região que sofre grande impacto devido as fábricas a que circundam. O hábito de fumar expõe o fumante a diversas substâncias, inclusive o benzeno, que é um contaminante ambiental local provenientes das fábricas. Por esta

razão o tabagismo pode aumentar ainda mais o desenvolvimento de patologias, não apenas pelos riscos a ele relacionados, mas ao sinergismo entre os componentes do tabaco e os contaminantes ambientais.

Como perspectivas futuras, além dos artigos já gerados, encontram-se em andamento a análise de indicadores biológicos de exposição ao benzeno, a fim de verificar o impacto do cigarro na exposição ambiental que esta população está submetida. Será considerada também a influência genética para vulnerabilidade à exposição ao benzeno, pela análise de variações em genes relacionados à metabolização desta substância. Após a conclusão destas análises, serão elaborados artigos para publicação em revistas científicas.

Os resultados apresentados nesta tese são de grande importância para o conhecimento das bases genéticas envolvidas no tabagismo e permitem uma melhor compreensão das diferenças interindividuais no comportamento tabágico na população brasileira. A identificação de variações genéticas relacionadas à dependência tabágica pode levar ao desenvolvimento de terapias de cessação que sejam mais eficazes e custos-efetivas. Este estudo pode contribuir para abordagens futuras em que o fator genético possa ser utilizado como mais um elemento a ser considerado na avaliação do paciente, para a definição de um protocolo individualizado e com maior chance de sucesso de cessação.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. E.; JOHNSON, D. C.; BATAL, H. A. Sudden Infant Death Syndrome and prenatal maternal smoking: rising attributed risk in the Back to Sleep era. **BMC medicine**, v. 3, p. 4, 2005.

APPLIED BIOSYSTEM. **TaqMan vs. SYBR Chemistry for Real-Time PCR**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>>. Acesso em: 22 ago. 2020.

ARAÚJO, J. A. et al. **Manual De Condutas E Práticas Em Tabagismo**. São Paulo: Ac Farmaceutica, 2012.

ARINAMI, T.; ISHIGURO, H.; ONAIVI, E. S. Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. **European Journal of Pharmacology**, v. 410, n. 2–3, p. 215–226, 27 dez. 2000.

BATRA, A. et al. The dopamine D2 receptor (DRD2) gene - a genetic risk factor in heavy smoking? **Addiction Biology**, v. 5, n. 4, p. 429–436, out. 2000.

BATRA, V. et al. The genetic determinants of smoking. **Chest**, v. 123, n. 5, p. 1730–1739, maio 2003.

BAZZANO, L. A. Relationship between Cigarette Smoking and Novel Risk Factors for Cardiovascular Disease in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 11, p. 891, 3 jun. 2003.

BENOWITZ, N. L. Nicotine addiction. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2295–2303, 17 jun. 2010. a

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 192, p. 29–60, 2009.

BERGEN, A. W. et al. Nicotinic acetylcholine receptor variation and response to smoking cessation therapies. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 23, n. 2, p. 94–103, fev. 2013.

BERRETTINI, W. et al. Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 368–373, abr. 2008.

BIDWELL, L. C. et al. NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 variants and smoking motives as intermediate phenotypes for nicotine dependence. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 7, p. 1177–1186, abr. 2015.

BIERUT, L. J. Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 104, p. S64–S69, out. 2009.

BIERUT, L. J.; TYNDALE, R. F. Preparing the Way: Exploiting Genomic Medicine to Stop Smoking. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 2, p. 187–196, fev. 2018.

BJERREGAARD, B. K. et al. The effect of occasional smoking on smoking-related cancers: in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Cancer causes & control: CCC**, v. 17, n. 10, p. 1305–1309, dez. 2006.

BUCZKOWSKI, K. et al. Association between Genetic Variants on Chromosome 15q25 Locus and Several Nicotine Dependence Traits in Polish Population: A Case-Control Study. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

BÜHLER, K.-M. et al. Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research: SNPs and drug addiction. **Addiction Biology**, v. 20, n. 5, p. 845–871, set. 2015.

CARPELLI, D. et al. Genetic Influence on Smoking — A Study of Male Twins. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 12, p. 829–833, 17 set. 1992.

CASTRO, M. R. P. DE et al. A dependência da nicotina associada ao uso de álcool e outras substâncias psicoativas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 131, 15 dez. 2008.

CAVALCANTE, T. M. O controle do tabagismo no Brasil: avanços e desafios. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 5, p. 283–300, out. 2005.

CHATKIN, J. M. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. **Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicação**

Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisiologia, v. 32, n. 6, p. 573–579, dez. 2006.

CHUANG, Y.-H. et al. Genetic variants in nicotinic receptors and smoking cessation in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 62, p. 57–61, maio 2019.

CLAGUE, J. et al. The D2 Dopamine Receptor Gene and Nicotine Dependence Among Bladder Cancer Patients and Controls. **Behavior Genetics**, v. 40, n. 1, p. 49–58, jan. 2010.

CONLON, M. S.; BEWICK, M. A. Single Nucleotide Polymorphisms in CHRNA5 rs16969968, CHRNA3 rs578776, and LOC123688 rs8034191 Are Associated With Heaviness of Smoking in Women in Northeastern Ontario, Canada. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 13, n. 11, p. 1076–1083, 1 nov. 2011.

COMINGS, D. E. et al. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 2, n. 1, p. 44–56, jan. 1997.

CONVENÇÃO-QUADRO PARA O CONTROLE DO TABACO (CQCT). Genebra, maio de 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-006/2006/Decreto/D5658.htm>. Acesso em: 02 abr. 2020.

DE MEI, C. et al. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 53–58, fev. 2009.

DE RUYCK, K. et al. Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 8, p. 1053–1063, ago. 2010.

DOLL, R. et al. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 309, n. 6959, p. 901–911, 8 out. 1994.

DOLL, R.; PETO, R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 32, n. 4, p. 303–313, dez. 1978.

DROPE, J. et al. **The Tobacco Atlas**. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies, 2018.

- DUCCI, F.; GOLDMAN, D. The Genetic Basis of Addictive Disorders. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 495–519, jun. 2012.
- ESTEVINHO, M. F.; SOARES-FORTUNATO, J. M. Dopamina E Receptores. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 5, n. 1, p. 21-31, junho 2003.
- FAGERSTROM, K.-O.; SCHNEIDER, N. G. Measuring nicotine dependence: A review of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. **Journal of Behavioral Medicine**, v. 12, n. 2, p. 159–182, abr. 1989.
- FORMIGONE, M. et al. **Neurobiologia: mecanismos de reforço e recompensa e os efeitos biológicos e os efeitos comuns às drogas de abuso**. Disponível em: <<http://www.aberta.senad.gov.br/medias/original/201612/20161212-174315-002/pagina-02.html>>. Acesso em: 23 abr. 2020.
- GANDINI, S. et al. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 1, p. 155–164, 1 jan. 2008.
- GAYA, P. V. et al. Could be applied genetic markers to smoking cessation treatment? **Tobacco Induced Diseases**, v. 16, n. 1, 1 mar. 2018.
- GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- GORDIEV, M. et al. Genetic analysis of polymorphisms in dopamine receptor and transporter genes for association with smoking among cancer patients. **European Addiction Research**, v. 19, n. 2, p. 105–111, 2013.
- GREENBAUM, L.; LERER, B. Differential contribution of genetic variation in multiple brain nicotinic cholinergic receptors to nicotine dependence: recent progress and emerging open questions. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 10, p. 912–945, out. 2009.
- HALL, W.; MADDEN, P.; LYNSKEY, M. The genetics of tobacco use: methods, findings and policy implications. **Tobacco Control**, v. 11, n. 2, p. 119–124, jun. 2002.
- HAMAJIMA, N. et al. Association between smoking habits and dopamine receptor D2 taqI A A2 allele in Japanese males: a confirmatory study. **Journal of Epidemiology**, v. 12, n. 4, p. 297–304, jul. 2002.

- HARDIE, T. L.; MOSS, H. B.; LYNCH, K. G. Genetic correlations between smoking initiation and smoking behaviors in a twin sample. **Addictive Behaviors**, v. 31, n. 11, p. 2030–2037, nov. 2006.
- HEATH, A. C. et al. Personality and the inheritance of smoking behavior: a genetic perspective. **Behavior Genetics**, v. 25, n. 2, p. 103–117, mar. 1995.
- HERMAN, A. I. et al. Pharmacogenetics of nicotine addiction: role of dopamine. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 2, p. 221–234, fev. 2014.
- HEY, K.; PERERA, R. Quit and Win contests for smoking cessation. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. CD004986, 2005.
- HO, M. K.; TYNDALE, R. F. Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 7, n. 2, p. 81–98, abr. 2007.
- HUANG, C.-L. et al. Effects of Interaction Between Dopamine D2 Receptor and Monoamine Oxidase A Genes on Smoking Status in Young Men. **Biological Research for Nursing**, v. 17, n. 4, p. 422–428, jul. 2015.
- HUKKANEN, J. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 79–115, 1 mar. 2005.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Tobacco smoke and involuntary smoking**, Vol. 83. World Health Organization. Lyon: IARC, 2004. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Tobacco smoking**, 2012. Disponível em:< <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100E/mono100E-6.pdf>>. Acesso em :02 Nov. 2017.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE.). **Tabagismo, 2008: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Consumo de cigarros per capita**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/1421>>. Acesso em: 22 Abr. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estudo Inédito divulga Custos Atribuíveis ao Tabagismo no Brasil**. 2017. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2017/estudo-inedito-divulga-custos-atribuiveis-ao-tabagismo-no-brasil>>. Acesso em: 20 Jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Programa Nacional de Controle do Tabagismo**. 2020a. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/programa-nacional-de-controle-do-tabagismo>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tabagismo e saúde da mulher**. 2020b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tabagismo/saude-da-mulher>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Tabagismo Um Grave Problema de Saúde Pública**. 2007. Disponível em: <
<<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/tabagismo-um-grave-problema-de-saude-publica>>. Acesso em: 03 abr.2018.

IMPROGO, M. R. D. et al. From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection. **Oncogene**, v. 29, n. 35, p. 4874–4884, 2 set. 2010a.

IMPROGO, MA. R. et al. Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2013.

IMPROGO, MA. R. D. et al. The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: Dual role in nicotine addiction and lung cancer. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 212–226, out. 2010b.

JICK, H.; PORTER, J. Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. **Lancet**, v. 1, n. 8026, p. 1354–1355, 25 jun. 1977.

JIN, Y. et al. Association between monoamine oxidase gene polymorphisms and smoking behaviour in Chinese males. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 9, n. 5, p. 557–564, out. 2006.

JOHNSTONE, E. C. et al. Genetic variation in dopaminergic pathways and short-term effectiveness of the nicotine patch. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 2, p. 83–90, fev. 2004.

JOHNSTONE, E. C. et al. Association of COMT Val108/158Met Genotype with Smoking Cessation in a Nicotine Replacement Therapy Randomized Trial. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 6, p. 1065–1069, 1 jun. 2007.

KARNATH, B. Smoking cessation. **The American Journal of Medicine**, v. 112, n. 5, p. 399–405, 1 abr. 2002.

KING, D. P. et al. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 641–650, fev. 2012.

KITA-MILCZARSKA, K.; SIEMINSKA, A.; JASSEM, E. Association Between CHRNA3 and CHRNA5 Nicotine Receptor Subunit Gene Variants and Nicotine Dependence in an Isolated Population of Kashubians in Poland. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1442–1450, 29 abr. 2016.

KLINK, R; et al. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1452–1463, 01 mar. 2001.

KOENEKE, A. et al. Ankyrin Repeat and Kinase Domain Containing 1 Gene, and Addiction Vulnerability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2516, 4 abr. 2020.

KREEK, M. J.; NIELSEN, D. A.; LAFORGE, K. S. Genes associated with addiction: alcoholism, opiate, and cocaine addiction. **Neuromolecular Medicine**, v. 5, n. 1, p. 85–108, 2004.

KIRCHENCHTEJN C, CHATKIN JM. Dependência da nicotina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2004; 30 (Supl 2): S11-S18. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000084&pid=S1806-3713200700050001100002&lng=en>. Acesso em: 21 jun. 2014.

KRIZ, P.; BOBAK, M.; KRIZ, B. Parental smoking, socioeconomic factors, and risk of invasive meningococcal disease in children: a population based case-control study. **Archives of Disease in Childhood**, v. 83, n. 2, p. 117–121, ago. 2000.

KUPER, H. et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 85, n. 4, p. 498–502, 15 fev. 2000.

LEPSHC, L. B. **Toxicidade causada pela cocaína in vitro: participação da via dopami-nérgica e do fator de transcrição NF-KB**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LESSOV-SCHLAGGAR, C. N. et al. Heritability of cigarette smoking and alcohol use in Chinese male twins: the Qingdao twin registry. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 5, p. 1278–1285, 1 out. 2006.

LEWIS, A.; MILLER, J. H.; LEA, R. A. Monoamine oxidase and tobacco dependence. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 1, p. 182–195, jan. 2007.

LI, M.; MA, J.; BEUTEN, J. Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behaviour: Susceptibility loci and genes for smoking behaviour. **Clinical Genetics**, v. 66, n. 5, p. 382–392, 24 ago. 2004.

LINS, T. C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, p. NA-NA, 2009.

MA, Y. et al. Updated Findings of the Association and Functional Studies of DRD2/ANKK1 Variants with Addictions. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 281–299, fev. 2015a.

MA, Y. et al. Updated Findings of the Association and Functional Studies of DRD2/ANKK1 Variants with Addictions. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 281–299, fev. 2015b.

MA, Y. et al. The significant association of Taq1A genotypes in DRD2/ANKK1 with smoking cessation in a large-scale meta-analysis of Caucasian populations. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 12, p. e686–e686, dez. 2015c.

MAES, H. H. et al. A twin study of genetic and environmental influences on tobacco initiation, regular tobacco use and nicotine dependence. **Psychological Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1251–1261, out. 2004.

MAGALHÃES, J. Z et al. Vareniclina: uma revisão na perspectiva da promoção da saúde. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v.16, n.2, p. 55-67, 2016.

MALBERGIER, A.; OLIVEIRA, JR, H. P. DA. Dependência de tabaco e comorbidade psiquiátrica. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 5, p. 276–282, out. 2005.

MARQUES, A. C. P. R. et al. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 23, n. 4, p. 200-214, 9 out. 2001.

MCLAUGHLIN, J. K. et al. International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 60, n. 2, p. 194–198, 17 jan. 1995.

MENDES, A. C. R. et al. Custos do Programa de Tratamento do Tabagismo no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 66, 11 out. 2015.

MENEZES, A. M. B.; ACHUTTI, A. Fumo ou saúde/ direitos ou deveres? **Jornal de Pneumologia**, v. 26, n. 6, p. IX–X, dez. 2000.

MORTON, L. M. et al. DRD2 genetic variation in relation to smoking and obesity in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 16, n. 12, p. 901–910, dez. 2006.

MOTA, C. L. et al. CHRNA5/CHRNA3 polymorphisms and tobacco smoking risk in a Brazilian population sample. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 143–152, 30 ago. 2020.

MOTA, C. L. et al. CHRNA5/CHRNA3 polymorphisms and tobacco smoking risk in a Brazilian population sample . **GSC Biological and Pharmaceutical Science**, v. 12, n. 2, p. 143-152, ago. 2020.

MOTA, N. R. et al. Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4 (suppl), p. 912–918, dez. 2012.

MOURA, A. C. M. **Prevalência do polimorfismo taq1a no gene do Receptor de dopamina do tipo d2 e seus possíveis efeitos em uma população de tabagistas do nordeste do Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2016.

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. **Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G.** *Scientia Médica*, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

MUNAFÒ, M. et al. The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. **Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 6, n. 4, p. 583–597, ago. 2004.

MUNAFÒ, M. R. et al. CHRNA3 rs1051730 Genotype and Short-Term Smoking Cessation. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 13, n. 10, p. 982–988, 1 out. 2011.

NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH. **Preventing Tobacco Use Among Youth and Young Adults: A Report of the Surgeon General.** Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2012.

NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH. **The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General.** Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p. 1445–1449, nov. 2005.

NEVILLE, M. J.; JOHNSTONE, E. C.; WALTON, R. T. Identification and characterization of ANKK1: A novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. **Human Mutation**, v. 23, n. 6, p. 540–545, jun. 2004.

NOBLE, E. P. et al. D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? **Medical Hypotheses**, v. 42, n. 4, p. 257–260, abr. 1994.

NUNES, S. O. V.; CASTRO, M. R. P. **Tabagismo: abordagem, prevenção e tratamento**. Londrina: EDUEL, 224 p., 2011.

O'BRIEN, C.P. Drug addiction and drug abuse. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw Hill, 2006.

OHMOTO, M. et al. Association Between Dopamine Receptor 2 TaqIA Polymorphisms and Smoking Behavior With an Influence of Ethnicity: A Systematic Review and Meta-Analysis Update. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 15, n. 3, p. 633–642, 1 mar. 2013.

OHMOTO, M. et al. Genetic influence of dopamine receptor, dopamine transporter, and nicotine metabolism on smoking cessation and nicotine dependence in a Japanese population. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, dez. 2014.

OTSUKA, R. et al. Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. **JAMA**, v. 286, n. 4, p. 436–441, 25 jul. 2001.

PEDNEAULT, M. et al. The association between CHRN genetic variants and dizziness at first inhalation of cigarette smoke. **Addictive Behaviors**, v. 39, n. 1, p. 316–320, jan. 2014.

PILIGUIAN, M. et al. Novel CYP2A6 variants identified in African Americans are associated with slow nicotine metabolism in vitro and in vivo. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 24, n. 2, p. 118–128, fev. 2014.

PINTO, M. et al. **Carga de doença atribuível ao uso do tabaco no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/carga-de-doenca-atribuivel-ao-uso-do-tabaco-no-brasil-e-potencial-impacto-do>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

POLESEL, J. et al. Tobacco smoking and the risk of upper aero-digestive tract cancers: A reanalysis of case-control studies using spline models. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 122, n. 10, p. 2398–2402, 15 maio 2008.

PORTES, L. H. et al. A Política de Controle do Tabaco no Brasil: um balanço de 30 anos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 6, p. 1837–1848, jun. 2018.

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Portaria Nº 761, de 21 de Junho de 2016. Valida as orientações técnicas do tratamento do tabagismo constantes no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Dependência à Nicotina. Diário Oficial da União. 21 de junho de 2016.

QUAAK, M. et al. Genetic variation as a predictor of smoking cessation success. A promising preventive and intervention tool for chronic respiratory diseases? **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 3, p. 468–480, 1 mar. 2009.

RADWAN, G. N. et al. DRD2/ANKK1 TaqI polymorphism and smoking behavior of Egyptian male cigarette smokers. **Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 9, n. 12, p. 1325–1329, dez. 2007.

REICHERT, J. et al. Diretrizes para cessação do tabagismo – 2008. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 10, p. 845-880, 7 out. 2008.

RODGMAN, ALAN.; PERFETTI, T. A. **The chemical components of tobacco and tobacco smoke.** Boca Raton, FL: CRC Press, 2013.

ROMERO, L. C.; SILVA, V. L. C. 23 Anos de Controle do Tabaco no Brasil: a Atualidade do Programa Nacional de Combate ao Fumo de 1988. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 3, p. 305-314, 13 junho 2011.

RON, D.; JURD, R. The “Ups and Downs” of Signaling Cascades in Addiction. **Science Signaling**, v. 2005, n. 309, p. re14–re14, 8 nov. 2005.

SACCONE, N. L. et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (*CHRN*) genes. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 4, p. 453–466, 5 jun. 2009.

SACCONE, S. F. et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 1, p. 36–49, 1 jan. 2007.

SALLOUM, N. C. et al. From Genes to Treatments: A Systematic Review of the Pharmacogenetics in Smoking Cessation. **Pharmacogenomics**, v. 19, n. 10, p. 861–871, jul. 2018.

SHAM, A. S. K. et al. The effects of tobacco use on oral health. **Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi / Hong Kong Academy of Medicine**, v. 9, n. 4, p. 271–277, ago. 2003.

SHARMA, R. et al. Nicotine administration in the wake-promoting basal forebrain attenuates sleep-promoting effects of alcohol. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 2, p. 323–331, out. 2015.

SIEMINSKA, A. et al. Influences of polymorphic variants of DRD2 and SLC6A3 genes, and their combinations on smoking in Polish population. **BMC medical genetics**, v. 10, p. 92, 2009.

SILVA, A.L.O. **As estratégias da Indústria do Tabaco para Enfraquecer as Políticas de Controle do Tabaco no Brasil**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (FIOCRUZ), 2019.

SILVA, C. B. et al. Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 22, n. 4, p. 329–342, dez. 2014.

SILVA, A. L. O. COVID-19 e tabagismo: uma relação de risco. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. e00072020, 18 març. 2020.

SILVA, C. B. et al. Environmental exposure to benzene: evaluation of urinary S-PMA and polymorphism (CYP2E1-1293G>C and NQO1 609C>T) in Campos Elíseos residents, Duque de Caxias, Rio de Janeiro State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 7, p. e00198618, 2019.

SJÖDAHL, K. et al. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 120, n. 1, p. 128–132, 1 jan. 2007.

STEPHENS, S. H. et al. Distinct Loci in the *CHRNA5 / CHRNA3 / CHRNB4* Gene Cluster Are Associated With Onset of Regular Smoking. **Genetic Epidemiology**, v. 37, n. 8, p. 846–859, dez. 2013.

SULLIVAN, P. F.; KENDLER, K. S. The genetic epidemiology of smoking. **Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 1 Suppl 2, p. S51-57; discussion S69-70, 1999.

TAYLOR, R.; NAJAFI, F.; DOBSON, A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. **International Journal of Epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 1048–1059, out. 2007.

THOMPSON, J. et al. D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. **Pharmacogenetics**, v. 7, n. 6, p. 479–484, dez. 1997.

TOMAZ, P. R. X. et al. CYP2B6 rs2279343 polymorphism is associated with smoking cessation success in bupropion therapy. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1067–1073, set. 2015.

TRUE, W. R. et al. Genetic and environmental contributions to smoking. **Addiction (Abingdon, England)**, v. 92, n. 10, p. 1277–1287, out. 1997.

VERDE, Z. et al. ‘Smoking Genes’: A Genetic Association Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26668, 26 out. 2011.

VIGITEL et al. **Vigitel Brasil 2006: vigilância de fatores e risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

VIGITEL et al. **Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores e risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

VINEIS, P. et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7486, p. 277, 5 fev. 2005.

WARE, J. J.; VAN DEN BREE, M. B. M.; MUNAFO, M. R. Association of the CHRNA5-A3-B4 Gene Cluster With Heaviness of Smoking: A Meta-Analysis. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 13, n. 12, p. 1167–1175, 1 dez. 2011.

WEN, L. et al. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 472–484, jan. 2016.

WHITE, M. J. et al. Behavioral phenotypes of impulsivity related to the ANKK1 gene are independent of an acute stressor. **Behavioral and Brain Functions**, v. 4, n. 1, p. 54, 2008.

WONNACOTT, S.; SIDHPURA, N.; BALFOUR, D. J. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 53–59, fev. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The empower package**. Geneva. World Health Organization, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/mpower/gtcr_download/en/>. Acesso em: 01 abr. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC 2019: offer help to quit tobacco use**. Place of publication not identified: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020.

XIAN, H. et al. The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit. **Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 5, n. 2, p. 245–254, abr. 2003.

YOSHIDA, K. et al. Association between the dopamine D2 receptor A2/A2 genotype and smoking behavior in the Japanese. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 10, n. 4, p. 403–405, abr. 2001.

ZDANOWICZ, MM; ADAMS, PW. The Pharmacogenetics of Nicotine Dependence and Smoking Cessation Therapies. **Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics**, v. 05, n. 04, 2014.

ZLOMUZICA, A. et al. The dopamine D2 receptor mediates approach-avoidance tendencies in smokers. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 268, n. 3, p. 261–268, abr. 2018.

ZOLI, M. et al. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 4, p. 338–349, 1 maio 2018.

ZUO, L. et al. Replicated Risk Nicotinic Cholinergic Receptor Genes for Nicotine Dependence. **Genes**, v. 7, n. 11, p. 95, 7 nov. 2016.

APÊNDICE - Questionário

Pesquisa: “Estudo da vulnerabilidade a contaminantes químicos ambientais em moradores da área sob influência do Pólo Industrial na região de Campos Eliseos, Baixada Fluminense”

Avaliação do Tabagismo

Data da Entrevista: | | | - | | | - | | | | | | Entrevistador: _____ Identificação: _____

ENTREVISTA

1. Nome Completo: _____

Data de Nascimento: | | | - | | | - | | | | | | 2. Idade: | | | [Anos Completados]

3. Endereço: _____ Nº: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: | | | | | | - | | |

4. Telefone de Contato: | | | | | | | | - | | | | | |

5. Em sua opinião, qual é sua cor da pele ou etnia?

Branca Amarela Parda Indígena Negra Não sabe/Não respondeu

6. Até que ano/série o senhor(a) estudou?

<input type="checkbox"/> Ensino Fundamental	<input type="checkbox"/> Ensino Médio	<input type="checkbox"/> Ensino Superior
<input type="checkbox"/> 1º ano (antigo CA)	<input type="checkbox"/> 1º ano	<input type="checkbox"/> Completo
<input type="checkbox"/> 2º ano (antiga 1ª série)	<input type="checkbox"/> 2º ano	<input type="checkbox"/> Incompleto
<input type="checkbox"/> 3º ano (antiga 2ª série)	<input type="checkbox"/> 3º ano	<input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu
<input type="checkbox"/> 4º ano (antiga 3ª série)	<input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu	
<input type="checkbox"/> 5º ano (antiga 4ª série)		
<input type="checkbox"/> 6º ano (antiga 5ª série)		
<input type="checkbox"/> 7º ano (antiga 6ª série)		
<input type="checkbox"/> 8º ano (antiga 7ª série)		
<input type="checkbox"/> 9º ano (antiga 8ª série)		
<input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu		

7. O senhor(a) recebeu diagnóstico por um médico com alguma dessas doenças/ problemas de saúde?

<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Acidente Vascular Cerebral (<i>Derrame</i>)
<input type="checkbox"/> Infarto ou Ataque Cardíaco	<input type="checkbox"/> Diabetes
<input type="checkbox"/> Doença de Olhos (<i>ex: Catarata</i>)	<input type="checkbox"/> Doença de Fígado (<i>ex: Hepatite</i>)
<input type="checkbox"/> Doença Cardiovascular (<i>ex: Hipertensão</i>)	<input type="checkbox"/> Doença Renal
<input type="checkbox"/> Doenças de Estômago/Intestino (<i>ex: Úlcera</i>)	<input type="checkbox"/> Câncer (<i>especifique</i>) _____
<input type="checkbox"/> Doenças Pulmonares (<i>ex: bronquite; asma; doença obstrutiva pulmonar crônica; enfisema pulmonar</i>)	<input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu
<input type="checkbox"/> outros (especifique) _____	

8. Algum familiar em primeiro grau apresentou câncer?

Não Sim Não sabe/Não respondeu

9. Renda familiar mensal: _____

Status Tabagista

1. O senhor(a) fuma ou já fumou algum produto de tabaco? (*cigarro industrializado, cigarro de palha ou enrolado à mão, cigarro de cravo ou bali, bidis ou cigarros indianos, cachimbo, charuto ou cigarrilha, narguilé, outros*)

Não. Nunca fumou. *Passa para questão A1.* Sim.

2. Somando todos os cigarros que já fumou a vida inteira o total chega a 5 maços ou 100 cigarros?

Não. Não chega a 5 maços ou 100 cigarros. *Passa para questão A1.* Sim. Chega a 5 maços ou 100 cigarros.

3. O senhor(a) fuma atualmente ou fumou só no passado?

Fuma atualmente. *Passa para questão B1.* Fumei no passado.

4. Há quanto tempo o senhor(a) parou de fumar? | | | dias | | | semanas | | | meses | | | anos.

Há menos de 1 ano. *Passa para questão B1.* Há 1 ano ou mais. *Passa para questão C1.*

A. Nunca Fumante (*indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos de 100 cigarros durante toda a vida*)

A1. Em relação às bebidas alcoólicas, o senhor(a) bebe ou já bebeu?

- Não sabe/Não respondeu. *Passa para questão A3.*
 Não. Nunca bebeu. *Passa para questão A3.*
 Sim. Só no passado. Idade Início | Idade Término
 Sim. Ainda bebe. Idade Início

A2. Com que frequência o senhor(a) bebe ou bebia?

- Diariamente Semanalmente
 Quinzenalmente Mensalmente
 Em eventos e festas Não sabe/Não respondeu.

A3. O senhor(a) foi diagnosticado por um médico com alguma desordem psiquiátrica?

- Depressão TOC
 Déficit de atenção Transtorno Bipolar
 Hiperatividade Outra _____
 Ansiedade Não sabe/Não respondeu.
 Transtorno do Pânico

A4. Faz uso de algum medicamento regularmente?

- Não | Sim (especifique) _____ Não sabe/Não respondeu.

A5. O senhor(a) convive ou conviveu com fumantes?

- Sim. Em casa.
 Sim. No trabalho.
 Sim. Com os amigos.
 Não

Que idade você tinha quando começou a conviver com o fumante?

- anos. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Não sabe/Não respondeu.

Que idade você tinha quando parou de conviver com o fumante?

- anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.

B. Fumante Atual (*indivíduos que já fumaram 100 ou mais cigarros durante a vida e fumam atualmente ou pararam de fumar a menos de 1 ano*)
 Marca: _____

B1. Qual tipo de produto de tabaco o senhor(a) já fez uso?

Idade de início:

Idade de Término | Fuma Atualmente

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Cigarro industrializado | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Cigarro de palha ou enrolado a mão | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Cigarros de cravo ou de Bali | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Bidis ou cigarros indianos | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Caclimbo | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Narguilé | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> outros (especifique) _____ | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="text"/> <input type="text"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |

Teste de Dependência Nicotínica de Fagerström (FTDN)

B2. Quanto tempo você demora para fumar seu primeiro cigarro depois de se levantar pela manhã?

- menos de 5 minutos (3 ponto) 6 a 30 minutos (2 pontos)
 31 a 60 minutos (1 ponto) mais de 60 minutos (0 ponto)

B3. Para você é difícil abster-se e não fumar naqueles lugares onde está proibido?

(*por exemplo: um hospital, biblioteca, igreja, ônibus etc.*)

- Sim (1 ponto) Não (0 ponto)

B4. Se tivesse de escolher, que cigarro lhe custaria mais deixar de fumar?

- o primeiro do dia (1 ponto) qualquer outro (0 ponto)

B5. Quantos cigarros você fuma por dia? | Cigarros por dia.

- 10 ou menos (0 ponto) 11 a 20 (1 ponto)
 21 a 30 (2 pontos) 31 ou mais (3 ponto)

B6. Habitualmente você fuma mais durante as primeiras horas do dia que durante o resto do dia?

- Sim (1 ponto) Não (0 ponto)

B7. Você fuma estando doente na cama?

Sim (1 ponto) Não (0 ponto)

B8. Como o senhor(a) começou a fumar?

Influência dos pais Vontade própria
 Influência dos amigos Modismo
 Efeito da propaganda Outros _____
 Não sabe/Não respondeu

B9. O senhor(a) já tentou parar de fumar alguma vez?

Sim
 Não. *Passar para questão B12.*
 Não sabe/Não respondeu. *Passar para questão B12.*

B10. Quantas vezes o senhor(a) já tentou parar de fumar?

vezes. Não sabe/Não respondeu.

B11. Pensando nas ocasiões que tentou parar de fumar, qual procedimento usou para tentar deixar de fumar?

Nenhum. Não usou nenhum procedimento. Vontade própria.
 Aconselhamento por profissional de saúde incluindo clínicas de cessação de fumar e grupo de apoio.
 Reposição de nicotina com: adesivo, pastilha, spray, inalador ou goma de mascar.
 Outros medicamentos com receita médica. (*especifique*) _____
 Homeopatia, acupuntura
 Chás, ervas ou plantas medicinais.
 Religião
 Algum outro procedimento. (*especifique*) _____

B12. Em relação à bebidas alcoólicas, o senhor(a) bebe ou já bebeu?

Não sabe/Não respondeu. *Passar para questão E14*
 Não. Nunca bebeu. *Passar para questão E14.*
 Sim. Só no passado. Idade Início | Idade Término
 Sim. Ainda bebe. Idade Início

B13. Com que frequência o senhor(a) bebe ou bebia?

Diariamente Semanalmente
 Quinzenalmente Mensalmente
 Em eventos e festas Não sabe/Não respondeu.

E14. O senhor(a) foi diagnosticado por um médico com alguma desordem psiquiátrica?

Idade quando foi diagnosticado:

Depressão TOC
 Déficit de atenção Transtorno Bipolar
 Hiperatividade Outra _____
 Ansiedade Não sabe/Não respondeu.
 Transtorno do Pânico

B15. Faz uso de algum medicamento regularmente?

Não Sim (especifique) _____ Não sabe/Não respondeu.

B16. O senhor(a) convive ou conviveu com fumantes?

Sim. Em casa.
 Sim. No trabalho.
 Sim. Com os amigos.
 Não

Que idade você tinha quando começou a conviver com o fumante?

anos. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Não sabe/Não respondeu.

Que idade você tinha quando parou de conviver com o fumante?

anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.

C. Ex-fumante

(*indivíduos que já fumaram pelo menos 100 cigarros durante toda a vida, mas pararam de fumar a pelo menos 1 ano*) Marca: _____

C1. Qual tipo de produto de tabaco o senhor(a) já fez uso?

Idade de início:

Idade de Término | Fuma Atualmente

Cigarro industrializado anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 Cigarro de palha ou enrolado a mão anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 Cigarros de cravo ou de Bali anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.

- Bidis ou cigarros indianos anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 Caclumbo anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 Narguilé anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.
 outros (especifique) _____ anos. Não sabe/Não respondeu. anos. Atualmente. Não sabe/Não respondeu.

C2. Como o senhor(a) começou a fumar?

- Vontade própria Efeito da propaganda Outros _____
 Influência dos amigos Influência dos pais Modismo Não sabe/Não respondeu

C3. Pensando nessa ocasião atual, em que o senhor(a) parou de fumar. O senhor usou algum procedimento para deixar de fumar?

- Aconselhamento por profissional de saúde incluindo clínicas de cessação de fumar e grupo de apoio
 Nenhum. Não usou nenhum procedimento. Vontade própria.
 Reposição de nicotina com: adesivo, pastilha, spray, inalador ou goma de mascar.
 Outros medicamentos com receita médica? (especifique) _____
 Homeopatia, acupuntura.
 Chás, ervas ou plantas medicinais?
 Religião
 Algum outro procedimento? (especifique) _____

C4. No passado, o senhor(a) já havia tentado parar de fumar alguma vez?

- Sim Não. *Passe para questão C7.* Não sabe/Não respondeu. *Passe para questão C7.*

C5. Quantas vezes?

- _____ Não sabe/Não respondeu.

C6. Pensando nas ocasiões que tentou parar de fumar, qual procedimento usou para tentar deixar de fumar?

- Nenhum. Não usou nenhum procedimento.
 Não sabe/Não respondeu
 Algum outro procedimento. (especifique) _____
 Chás, ervas ou plantas medicinais.
 Homeopatia, acupuntura
 Outros medicamentos com receita médica. (especifique) _____
 Reposição de nicotina com: adesivo, pastilha, spray, inalador ou goma de mascar.
 Religião
 Aconselhamento por profissional de saúde incluindo clínicas de cessação de fumar e grupo de apoio.

C7. Em relação à bebidas alcoólicas, o senhor(a) bebe ou já bebeu?

- Não sabe/Não respondeu. *Passe para questão C9.*
 Não. Nunca bebeu. *Passe para questão C9.*
 Sim. Só no passado. Idade Início | Idade Término
 Sim. Ainda bebe. Idade Início

C8. Com que frequência o senhor(a) bebe ou bebia?

- Diariamente Semanalmente
 Quinzenalmente Mensalmente
 Em eventos e festas Não sabe/Não respondeu.

C9. O senhor(a) foi diagnosticado por um médico com alguma desordem psiquiátrica?

Idade quando foi diagnosticado:

- Depressão TOC
 Déficit de atenção Transtorno Bipolar
 Hiperatividade Outra _____
 Ansiedade Não sabe/Não respondeu.
 Transtorno do Pânico

C10. Faz uso de algum medicamento regularmente?

- Não Sim (especifique) _____ Não sabe/Não respondeu.

C11. O senhor(a) convive ou conviveu com fumantes?

- | | | |
|--|---|--|
| | Que idade você tinha quando começou a conviver com o fumante? | Que idade você tinha quando parou de conviver com o fumante? |
| <input type="checkbox"/> Sim. Em casa. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Sim. No trabalho. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Sim. Com os amigos. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. | <input type="checkbox"/> anos. <input type="checkbox"/> Atualmente. <input type="checkbox"/> Não sabe/Não respondeu. |
| <input type="checkbox"/> Não | | |