

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**EFEITOS DO COMPLEXO GÊNICO CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4
SOBRE O TDAH, A COGNIÇÃO E O TABAGISMO**

Evelise Regina Polina

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Claiton H. D. Bau

Porto Alegre, Janeiro de 2014

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – DECIT/PPSUS) como instituições financeiras. A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes".*

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Claiton Bau**, pela paciência e ajuda ao longo desses anos, pelo incentivo e por sempre ter as ideias para tentar explicar os achados científicos e pelo seu entusiasmo ao falar delas.

À Professora **Mara Hutz**, pelo carinho e amizade, pelo interesse no meu trabalho e por me aceitar como parte da sua ‘família de orientadas’.

À Professora **Sidia Callegari-Jacques**, pela disposição em ajudar e por ser um exemplo de professora.

Ao **Elmo**, por estar sempre disposto a ajudar e resolver os problemas burocráticos.

Aos **amigos e colegas da sala 109**, antigos e atuais. À **Verônica**, agradeço pela amizade, pela ajuda desde o início, ainda na iniciação científica e pelas risadas compartilhadas. Ao **Guilherme**, que já partiu em rumo de novas experiências, pelo carinho e pelos momentos de descontração, sempre me diverti muito quando estava de bom humor! Ao **Lucas**, pela amizade e ajudas científicas. Ao **Diego**, também pela amizade, pela paciência, pelas discussões científicas ou não e por estar sempre disposto a ajudar com as análises estatísticas. À **Nina**, pela ajuda com PLINK. À **Jaqueline**, minha atual vizinha de mesa que está sempre querendo que eu beba cachaça com ela, pelos papos e risadas. À **Renata**, pelas conversas descontraídas e risadas. À **Bruna**, que chegou recentemente, e está sempre disposta a ajudar.

Aos **colegas de laboratório 114 e 116** pela convivência e companheirismo, pelos bate-papos científicos ou não, pelas risadas divididas e pela companhia no almoço.

Aos **colegas do PRODAH de adultos**, pelo esforço e dedicação na coleta da amostra e contribuição nos artigos.

Às **amigas queridas** que o Departamento de Genética me proporcionou. À **Luciana Tovo**, uma amiga para todas as horas, que está sempre disposta a me ajudar e me ouvir, agradeço pelos conselhos, pela força e incentivo constante. She is the best classmate e companheira fiel nas idas ao Cavanhas depois do inglês ou a qualquer momento simplesmente porque deu vontade. À **Angélica**, pela alegria contagiante, pelos abraços apertados, pelo apoio e ajuda a qualquer momento e pela companhia em congressos e viagens. À **Juliana**, por ser minha co-piloto durante os meses que fomos

praticamente vizinhas, sendo uma divertida companhia até o vale, também agradeço pela ajuda e apoio nos momentos difíceis. À **Estela**, pelas palavras de carinho, pelo incentivo constante e pela parceria em viagens e congressos. À **Deise**, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo apoio e incentivo, e pela companhia nas viagens. À **Mariana Botton**, pelos divertidos papos pelas salinhas e corredores e por seu bom humor quando pegamos tanto no pé dela. À **Luciana Lima**, pelo carinho e amizade. À **Mariana Rieck**, por dividir comigo as deliciosas romãs. Enfim, agradeço a todas pela amizade e carinho, pelos agradáveis momentos no café, pelas conversas e gargalhadas compartilhadas, pelas jantinhas especiais, e por tornarem a ida ao vale muito mais divertida!

Aos meus **Amigos e Familiares**, de perto e de longe, pelo apoio e incentivo, por se fazerem, de alguma forma, sempre presentes, por tornarem minha vida melhor e mais feliz e por fazerem de cada encontro um momento de alegria. Vocês são todos muito importantes e especiais para mim.

À minha família

Minha irmã **Kátia** e meu cunhado **Joni** pela ajuda, pelo convívio diário (pelo menos por um tempo), pelos papos, risadas e brincadeiras, e principalmente por terem me presenteado com a sobrinha/afilhada **Gabriele**, a menina mais linda e mais fofa que conheço! Obrigada **Gabi** por iluminar e alegrar a minha vida e me encantar cada dia mais. Essa boneca foi meu antiestresse! Como não se render ao seu sorriso, seu olhar e sua bagunça!?

Meu irmão **Everton**, minha cunhada **Viviane** e meu sobrinho emprestado **Luka**, pelas brincadeiras e risadas, pela companhia na volta ao mundo da culinária e pela divertida companhia em passeios e viagens. Além disso, pela lasanha de abobrinha e pelo delicioso *petit gateau*, *HUMMMMMM!!!!!!*

Minha mãe **Lourdes**, pelo apoio, carinho e incentivo em todos os momentos, por sempre acreditar em mim, às vezes mais que eu mesma, e pelo amor incondicional. Agradeço pelo chimarrão todas as manhãs e pela comidinha gostosa sempre pronta, principalmente nos últimos meses. Obrigada pela companhia diária e por ser tudo para mim!

E sem esquecer a **Dory** e a **Kika**, as cachorrinhas mais lindas e queridas, companheiras em todos os momentos, até enquanto escrevia a tese!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
Capítulo I INTRODUÇÃO	11
1.1 Considerações Iniciais.....	12
1.2 Tabagismo	12
1.3 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)	17
1.4 TDAH e Tabagismo	20
1.5 O efeito de substâncias no cérebro	23
1.6 Receptores Nicotínicos.....	26
1.6.1 O Complexo Gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4.....	30
Capítulo II JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	34
2.1 Justificativas	35
2.2 Objetivo Geral	36
2.3 Objetivos Específicos.....	36
Capítulo III ARTIGO #1	37
Capítulo IV ARTIGO #2.....	63
Capítulo V DISCUSSÃO GERAL	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	116
Anexo 1 – Produção Científica Adicional no Período de Doutorado.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HTT	Gene da Proteína Transportadora de Serotonina
ACh	Acetilcolina
ATV	Área Tegumentar Ventral
CDH13	Gene da Caderina 13
CHRNA3	Gene do Receptor Nicotínico Subunidade alfa-3
CHRNA5	Gene do Receptor Nicotínico Subunidade alfa-5
CHRNA6	Gene do Receptor Nicotínico Subunidade alfa-6
CHRNA3	Gene do Receptor Nicotínico Subunidade beta-3
CHRNA4	Gene do Receptor Nicotínico Subunidade beta-4
CPF	Córtex Pré-Frontal
DA	Dopamina
CYP2A6	Gene do Citocromo P450 2A6
DAT	Transportador de Dopamina
DAT1	Gene da Proteína Transportadora de Dopamina
DRD2	Gene do Receptor D2 de Dopamina
DRD4	Gene do Receptor D4 de Dopamina
DRD5	Gene do Receptor D5 de Dopamina
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
GWAS	Estudo de Associação por Varredura Genômica
HTR1B	Gene do Receptor 1B de Serotonina
IPN	Nucleus Interpeduncular
LHb	Habenula Lateral
MHb	Habenula Medial
MPH	Metilfenidato
mRNA	RNA mensageiro
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
QI	Quociente de Inteligência
SNAP25	Gene da Proteína Associada ao Sinaptossoma de 25kDa

SNC Sistema Nervoso Central
TAG Transtorno de Ansiedade Generalizada
TC Transtorno de Conduta
TDAH Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDM Transtorno Depressivo Maior
THB Transtorno de Humor Bipolar
TOD Transtorno Opositor Desafiante
TPAS Transtorno de Personalidade Antissocial
TUS Transtorno por Uso de Substâncias

O tabagismo é o transtorno por uso de substância mais prevalente, sendo a segunda causa de morte evitável no mundo. O tabagismo é fortemente relacionado com transtornos psiquiátricos, entre eles o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH). Há evidências de que o TDAH é um fator de risco e pode influenciar os mecanismos moleculares do tabagismo. A prevalência de tabagistas entre os pacientes com TDAH é maior quando comparada com a população geral. A cognição pode ser influenciada pelo tabagismo de maneira positiva e negativa, enquanto se observa uma melhora no desempenho cognitivo de alguns indivíduos, em outros é observado o efeito oposto, acarretando déficits permanentes. A nicotina atua através dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), que estão envolvidos em diversos processos no sistema nervoso central. Os nAChRs são importantes para modular a liberação de neurotransmissores como dopamina, acetilcolina e glutamato. O complexo gênico *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* codifica as subunidades $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$ de receptores nicotínicos, respectivamente. Estudos de associação e GWAS têm demonstrado esse complexo como importante na suscetibilidade ao tabagismo, assim como em outros transtornos psiquiátricos e na cognição. No presente trabalho, foram avaliados oito polimorfismos do complexo gênico na suscetibilidade ao tabagismo em pacientes com e sem TDAH e no desempenho cognitivo em pacientes com TDAH. A amostra foi composta por 1118 indivíduos, incluindo tabagistas e não tabagistas com TDAH e tabagistas e não tabagistas da população geral. Destes, em 313 tabagistas e não tabagistas com TDAH foi avaliado o desempenho cognitivo. Nossos resultados apontam associação de dois polimorfismos (rs578776 e rs3743078) com um maior risco para o tabagismo somente em pacientes com TDAH. Com relação à cognição, outros dois polimorfismos (rs588765 e rs8023462) foram associados com alto e baixo desempenho cognitivo, respectivamente. Além disso, a interação do polimorfismo rs588765 com o tabagismo mostrou resultado significativo, no qual o efeito positivo do polimorfismo é anulado pelo uso de nicotina. Nossos resultados confirmam o papel do complexo gênico *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* no tabagismo e na cognição, e reforçam o papel do TDAH como modulador na suscetibilidade ao tabagismo.

ABSTRACT

Tobacco smoking is the most prevalent substance use disorder, considered the second cause of preventable death worldwide. Tobacco smoking is associated with psychiatric disorders, such as attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). There is evidence that ADHD is a risk factor and can influence the molecular mechanisms of tobacco smoking. The prevalence of smoking in patients with ADHD is higher when compared with general population. Cognition may be influenced by smoking in a positive or negative way, while it is observed an improvement in cognitive performance in some individuals, for others it is observed the opposite effect, leading to permanent deficits. Nicotine acts through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are involved in a wide range of processes in central nervous system. nAChRs are important to modulate the release of neurotransmitter such as dopamine, acetylcholine and glutamate. CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster encodes the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 5$, $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits. Association studies and GWAS have demonstrated this cluster as relevant in the susceptibility of tobacco smoking, as well as in others psychiatric disorders and cognition. In the present study, eight polymorphisms in the gene cluster were analyzed in the susceptibility to smoking in patients with and without ADHD and in cognitive performance in patients with ADHD. The sample comprised 1118 individuals including smokers and nonsmokers with ADHD and smokers and nonsmokers from general population. Among these, in 313 smokers and nonsmokers with ADHD the cognitive performance was evaluated. Our results showed an association of two polymorphisms (rs578776 e rs3743078) with an increased risk for tobacco smoking only in patients with ADHD. Regarding cognition, another two polymorphisms (rs588765 e rs8023462) were associated with high and low cognitive performance, respectively. Moreover, the interaction between rs588765 polymorphism and smoking showed significant results, in which the positive effect of the polymorphism seems to be inhibited by nicotine use. Our results confirm the role of CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster in tobacco smoking and cognition, and reinforce the role of ADHD as modulating tobacco smoking susceptibility.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

O uso de substâncias é muito difundido em várias sociedades e atinge principalmente adolescentes e adultos jovens. As substâncias mais amplamente utilizadas são nicotina (na forma de cigarro de tabaco), álcool (disponível em diversas formas de bebidas), maconha, cocaína, heroína e opióides (OMS, 2007). O consumo de substâncias compreende dois principais mecanismos de ação: o primeiro envolve o efeito tóxico da substância, seja imediato ou em longo prazo, de forma cumulativa; e o segundo envolve a dependência da substância, no qual o uso tornou-se habitual, o usuário não escolhe usar a substância apenas pelos seus efeitos aparentemente benéficos e a vontade de utilizar não está mais sob o controle do usuário (Goforth et al., 2010).

O uso de substâncias é altamente relacionado com transtornos psiquiátricos. Indivíduos diagnosticados com algum transtorno psiquiátrico tem uma maior suscetibilidade ao uso de substâncias quando comparados com a população em geral (Lising-Enriquez and George, 2009; Aubin et al. 2012; Jamal et al. 2012). Os transtornos psiquiátricos são muito frequentes na população mundial e acarretam prejuízos importantes na vida dos indivíduos. A maioria dos transtornos possui herança complexa ou multifatorial, no qual diversos genes, cada um com pequeno efeito, agem juntamente com variáveis do ambiente no desencadeamento da doença. Sendo assim, a genética psiquiátrica busca uma melhor compreensão dos genes que possam estar envolvidos no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como o tabagismo e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e nas suas inter-relações.

1.2 Tabagismo

O tabaco é uma droga causadora de dependência e é uma das drogas mais amplamente usada em todo o mundo, sendo que a maioria inicia o hábito na adolescência. Mundialmente, estima-se que aproximadamente 1 bilhão de homens e 250 milhões de mulheres são fumantes, sendo o tabagismo considerado um grave problema de saúde pública (WHO, 2011). No Brasil, 14,8% da população acima de 18 anos são fumantes, sendo Porto Alegre a capital brasileira com maior prevalência, 23% (VIGITEL, 2011). Além disso, o tabagismo é a segunda causa de morte evitável no mundo segundo a

Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011). O consumo de tabaco provoca efeitos crônicos na saúde do usuário e está associado à mortalidade por doença pulmonar obstrutiva crônica, doença coronariana, hipertensão arterial, acidente vascular encefálico e diversos tipos de câncer, entre eles pulmão, boca, laringe, faringe, esôfago e pâncreas (INCA, 2011; WHO, 2011). A ocorrência desses e outros problemas adversos dependerão da quantidade, da forma e do padrão de uso da substância, porém a exposição à fumaça de produtos de tabaco (tabagismo secundário) já é um fator que contribui para o desenvolvimento ou agravamento de diversas outras doenças (Frishman et al., 2006; Berggren et al., 2007; INCA, 2011).

O modo de uso de tabaco é variável, porém o cigarro é a forma de tabaco mais comumente usada em todo o mundo (Cummings et al., 2009). O cigarro contém mais de quatro mil componentes diferentes, entre eles monóxido de carbono, fenol, ácido acético, dióxido de nitrogênio e nicotina (Miller and Cocores, 1991). A nicotina é apontada como o principal agente psicoativo responsável pelo desenvolvimento e manutenção da dependência, efeitos cognitivos e síndrome de abstinência (Henningfield et al., 1985, 2009; Pickworth et al., 1999; Brennan et al., 2010). De acordo com um dos cientistas de uma das maiores companhias de tabaco “Ninguém jamais se tornou tabagista por fumar cigarros sem nicotina”, afirmando a importância da nicotina encontrada no cigarro (Dunn, 1972 citado em Cummings et al., 2009). Embora haja consenso que a nicotina é responsável pela dependência, ainda há muita variação individual na resposta a essa substância, com muitos indivíduos tornando-se totalmente dependentes enquanto outros parecem ser capazes de interromper o uso com facilidade (Cummings et al., 2009).

A nicotina, no sistema nervoso central (SNC), influencia a atividade neuronal, a comunicação sináptica e o comportamento através da sua interação com receptores de membrana específicos conhecidos como receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs; Mansvelder and McGehee, 2002; Gotti et al., 2009). Ao ativar esses receptores, a nicotina, assim como outras drogas, promove um aumento na liberação de neurotransmissores, entre eles a dopamina (DA) em regiões do cérebro importantes para o desenvolvimento de abuso de substâncias. As vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical têm origem na área tegumentar ventral (ATV). A primeira conecta-se com o sistema límbico (*nucleus accumbens*, hipocampo e amígdala) e está envolvida na recompensa e no reforço do uso de substâncias. Já a segunda projeta-se para regiões corticais, incluindo o córtex pré-frontal

(CPF), estando relacionada com vários processos cognitivos (Genro et al., 2010; Jasinska et al., 2013). As regiões consideradas importantes para o desenvolvimento da dependência de substâncias, como o CPF, a ATV, o *nucleus accumbens*, e o *striatum*, além das projeções DAérgicas, contêm projeções glutamatérgicas e GABAérgicas, nas quais estão presentes uma alta concentração de nAChRs (Figura 1; Mihailescu and Drucker-Colin, 2000; Gotti and Clementi, 2004; Herman and Sofuoglu, 2010; Dichter et al., 2012). A ATV contribui para a dependência ao sinalizar para o cérebro que as substâncias são importantes de uma perspectiva emocional e é responsável pela compulsão pelo uso da substância (Wise, 1998; Gotti and Clementi, 2004; Kalivas and Volkow, 2005). O córtex está envolvido nos efeitos das substâncias sobre as sensações e percepções, além dos comportamentos e pensamentos complexos envolvidos na fissura e no uso descontrolado das substâncias (Volkow et al., 2012). O *nucleus accumbens* está envolvido na motivação e aprendizado, terminais DAérgicos se projetam até essa região na qual as substâncias psicoativas aumentam a liberação de DA, sendo que esse evento é significativo no reforço do uso da substância (Cardinal et al., 2002; Barik and Wonnacott, 2009; Volkow et al., 2012).

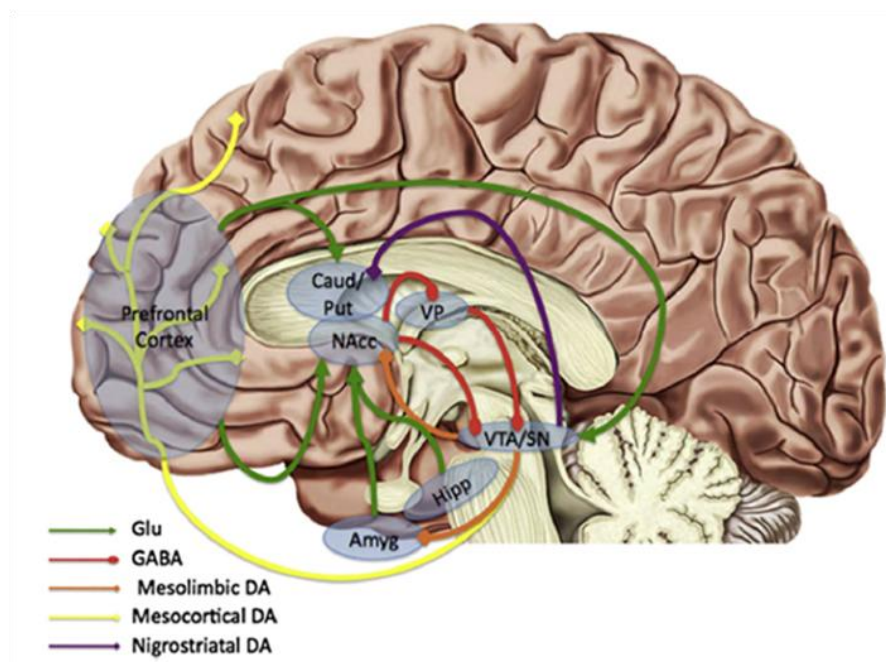


Figura 1: Ilustração esquemática da via DA e circuitos que regulam a liberação de DA no cérebro. Os neurônios DA na ATV/substância nigra (SN) projetam-se para o nucleus accumbens (via mesolímbica; laranja) e para o córtex (via mesocortical; amarela). Fibras glutamatérgicas excitatórias (verde) projetam-se do CPF, amígdala e hipocampo para nucleus accumbens (NAcc). As projeções GABAérgicas (vermelho) são enviadas do NAcc para o pallidum ventral que reprime essa região e por consequência inibe a ATV, facilitando assim o disparo dos neurônios DA na ATV. Amyg: amígdala; DA: dopamina; GABA: projeções GABAérgicas; Glu: projeções glutamatérgicas; Hipp: hipocampo; VP: pallidum ventral; NAcc: nucleus accumbens (Fonte: Dischter e cols. 2012)

A dependência não afeta somente os circuitos envolvidos na recompensa, mas também aqueles envolvidos com memória (hábitos/condicionamento), motivação, função executiva (controle inibitório e tomada de decisão) e humor (Volkow et al., 2012). Assim como ocorre com outras substâncias, a exposição à nicotina provoca neuroadaptações cerebrais, como o condicionamento ou aprendizagem, através da modulação da DA nas regiões subcortical e cortical. Devido ao condicionamento cerebral, um estímulo neutro que está ligado com o efeito reforçador de uma substância, é capaz de aumentar a liberação de DA em regiões cerebrais em antecipação a recompensa. Esse efeito está associado com o comportamento de procura pela substância e o intenso desejo pelo uso da substância (Kalivas and Volkow, 2005; Volkow et al., 2012).

Há evidências de estudos de gêmeos, famílias e adoção de que fatores genéticos têm um papel importante no tabagismo e contribuem para a variação individual observada. As estimativas de herdabilidade mostram que ela é significativa em diferentes estágios do tabagismo como iniciação ao fumo, progressão a dependência de nicotina e interrupção do uso de tabaco, além de poder ser influenciada pelo sexo (Li, 2003; Hamilton et al., 2006; Schnoll et al., 2007). Um estudo de gêmeos estimou a herdabilidade para a iniciação ao tabagismo em 44% tanto para homens como para mulheres; e de 75% para a dependência (Vink et al., 2005). Com relação à cessação do tabagismo, estima-se uma herdabilidade de aproximadamente 50% (Schnoll et al., 2007). Pessoas adotadas tem uma probabilidade de duas a cinco vezes maior de se tornarem fumantes se os irmãos biológicos (em ambientes separados) forem fumantes. Observou-se também que homens adotados tem maior probabilidade de se tornarem fumantes se sua mãe biológica for fumante (Osler et al., 2001).

Estudos de associação têm sido amplamente utilizados para compreender a suscetibilidade genética de transtornos psiquiátricos como o tabagismo. Os genes candidatos são selecionados por serem possivelmente relevantes para a neurobiologia do transtorno ou por resultados significativos em estudos de associação por varredura genômica (GWAS). Os estudos de varredura genômica e meta-análises de GWAS têm mostrado resultados significativos para os complexos gênicos contendo os genes dos receptores nicotínicos subunidade alfa-5 (CHRNA5), subunidade alfa-3 (CHRNA3) e subunidade beta-4 (CHRNA4) presentes no cromossomo 15q e subunidade alfa-6 (CHRNA6) e subunidade beta-3 (CHRNA3) no cromossomo 8p, além do gene da enzima de metabolização da nicotina citocromo P450 2A6 (CYP2A6; Bierut et al., 2007; Thorgeirsson et al., 2008, 2010; Furberg et al., 2010; Liu et al., 2010). Uma meta-análise anterior já havia demonstrado resultados significativos também para o gene do receptor D2 de dopamina (DRD2), da proteína transportadora de serotonina (5-HTT/SLC6A4) e da enzima de metabolização da nicotina CYP2A6 (Munafò et al., 2004).

Além disso, sabe-se que fatores ambientais também têm influência no tabagismo, apesar do pouco conhecimento sobre eles. No entanto, acredita-se que baixo nível socioeconômico, problemas familiares, além de aspectos culturais e sociais podem ser apontados como fatores que têm influência sobre a dependência (de Viron et al., 2013; Hayatbakhsh et al., 2013). Christakis and Fowler (2008) avaliaram como aspectos sociais influenciam a cessação do uso de nicotina. Os resultados mostraram que fumantes, cuja rede social incluía uma parte crescente de não fumantes ou ex-fumantes estavam mais propensos a parar de fumar ao longo do tempo, enquanto aqueles cuja rede social era principalmente de fumantes continuavam a fumar. Esses achados demonstram um papel do ambiente no tabagismo, e assim como as relações sociais influenciam a cessação do uso, elas também são importantes na iniciação ao uso da nicotina.

A prevalência de tabagismo é maior em pacientes com outros transtornos psiquiátricos do que na população geral. Destacam-se as associações com o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), foco da presente Tese, bem como esquizofrenia, transtorno depressivo maior (TDM), transtorno de humor bipolar (THB), transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e dependência de álcool (Lising-Enriquez and George, 2009; Morisano et al., 2009; Sousa et al., 2011; Aubin et al., 2012; Jamal et al., 2012).

1.3 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

O TDAH é um transtorno de neurodesenvolvimento comum e complexo caracterizado por desatenção, desorganização, distração, humor instável, hiperatividade, inquietação e impulsividade, causando prejuízos significativos na vida dos indivíduos (Adler, 2008; Franke et al., 2012). O TDAH está entre os transtornos psiquiátricos mais frequentes na infância, atingindo uma prevalência de 5,3% das crianças em idade escolar no mundo todo (Polanczyk et al., 2007). Diferentemente do que se pensava há algumas décadas, o TDAH persiste durante a adolescência e idade adulta, atingindo uma prevalência entre 2,5 e 4,9% em adultos (Franke et al., 2012).

As características predominantes do TDAH em adultos diferem do TDAH típico em crianças, apresentando os adultos relativamente menos sintomas de hiperatividade e impulsividade e mais sintomas de desatenção (Franke et al., 2012). Os prejuízos associados ao TDAH são principalmente nas relações sociais e acadêmicas, sendo diferentes de acordo com a fase do desenvolvimento. Crianças e adolescentes com o transtorno apresentam baixo desempenho escolar, altas taxas de repetência, expulsões, abandono escolar, além de delinquência, problemas de conduta e experimentação e abuso precoce de substâncias. Em adultos o TDAH está relacionado com dificuldades nos relacionamentos, altas taxas de divórcios e separações, esquecimento das contas a pagar, dificuldade na organização de tarefas e do tempo, condução imprudente de veículos (maiores taxas de acidentes de trânsito e infrações por excesso de velocidade), além de alta frequência na troca de empregos (Haavik et al., 2010; Kieling and Rohde, 2012).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM; American Psychiatric Association, 1994) reconhece os sintomas comportamentais do TDAH em duas dimensões distintas, uma relacionada à desatenção e outra refletindo uma combinação de hiperatividade e impulsividade. Essas dimensões podem ser expressas em diferentes graus entre os pacientes retratando os principais subtipos do transtorno como predominante desatento, predominante hiperativo-impulsivo e combinado, que é o mais frequente e o mais debilitante. Adultos diagnosticados com TDAH devem apresentar início dos sintomas na infância e persistir com os sintomas após a adolescência.

O TDAH é um transtorno heterogêneo com considerável variabilidade interindividual, refletindo a diversidade de vias causais que levam ao desenvolvimento do

transtorno, entre eles anormalidades do SNC e fatores genéticos (Purper-Ouakil et al., 2011). O desenvolvimento do TDAH está relacionado com anormalidades estruturais e funcionais em regiões específicas do cérebro. Entre as principais regiões relacionadas ao transtorno encontram-se o córtex frontal e parietal, os gânglios da base, o cerebelo e o hipocampo (Purper-Ouakil et al., 2011). Estudos de neuroimagem mostram que indivíduos com TDAH exibem uma redução global do cérebro quando comparado com controles, em crianças essa redução pode variar entre 3% e 8%, e algumas áreas específicas apresentam diferenças mais proeminentes, como um volume reduzido do córtex pré-frontal (CPF; Castellanos and Tannock, 2002; Kieling et al., 2008; Carmona et al., 2009; Mahone et al., 2011). Além disso, foi observado que a normalização dos volumes ao longo do desenvolvimento em regiões como córtex parietal e hipocampo resultam em uma melhora clínica dos sintomas, enquanto que a progressiva redução de volume no cerebelo e hipocampo é associada com persistência dos sintomas (Giedd and Rapoport, 2010).

O mecanismo de ação do metilfenidato (MPH), principal agente farmacológico para o tratamento do TDAH, reforça a hipótese de que o transtorno está vinculado a uma disfunção DAérgica (Genro et al., 2010), visto que ele atua bloqueando o transportador de dopamina (DAT), impedindo assim a recaptção da DA e por consequência aumentando a disponibilidade desse neurotransmissor no cérebro (Volkow et al., 2005). No entanto, ainda há muitas inconsistências na literatura, entre elas a discrepância na quantidade de DAT no cérebro de pacientes com TDAH, assim como a disponibilidade de receptores de DA (Del Campo et al., 2011). Apesar das inconsistências, estudos de neuroimagem mostram que a neurotransmissão DAérgica no cérebro está interrompida no TDAH e pode ser responsável por sintomas de desatenção e impulsividade (Volkow et al., 2009). Além disso, há evidências de que pacientes com o transtorno apresentam déficits de recompensa e motivação, necessitando de incentivos mais fortes, além de preferirem pequenas recompensas imediatas ao invés de recompensas maiores mais tarde (Tripp and Wickens, 2008; Volkow et al., 2011). Estudos de neuroimagem mostraram uma menor ativação da via DAérgica de recompensa em pacientes com TDAH, causando assim déficits motivacionais e de recompensa (Volkow et al., 2009).

Estudos de família têm mostrado um maior risco para o desenvolvimento do TDAH entre os pais e irmãos de crianças com o transtorno e entre os filhos de adultos com TDAH (Purper-Ouakil et al., 2011; Franke et al., 2012). A agregação familiar dos sintomas de

TDAH pode ser explicada devido ao compartilhamento de fatores genéticos e ambientais. Estudos de adoção e gêmeos são usados para elucidar as contribuições relativas dos genes e do ambiente na variação fenotípica do TDAH. Evidências apontam que os fatores genéticos explicam uma grande proporção da variabilidade do transtorno, sendo estimada uma herdabilidade de 76% (Faraone et al., 2005). Diversos fatores ambientais têm sido reconhecidos como fatores de risco para o TDAH, entre eles eventos intrauterinos como ansiedade e estresse materno durante a gravidez, complicações na gestação ou no parto, uso de substâncias pela mãe durante a gravidez, exposição pré-natal a toxinas ambientais, baixo peso ao nascer e prematuridade. Além disso, convulsões, lesões cerebrais e altos níveis de conflitos familiares são apontados como fatores ambientais pós-natal (Purper-Ouakil et al., 2011; Thapar et al., 2012). Sendo assim, a suscetibilidade ao TDAH é considerada multifatorial, na qual a combinação de fatores genéticos e ambientais atua na manifestação dos sintomas.

Devido à participação de fatores genéticos no desenvolvimento do TDAH, diversos estudos têm buscado identificar os genes envolvidos (Faraone and Mick, 2010; Akutagawa-Martins et al., 2013). Estudos de meta-análise indicam resultados significativos para o gene da proteína transportadora de dopamina (DAT1/SLC6A3), do receptor D4 de dopamina (DRD4), do receptor D5 (DRD5), da proteína transportadora de serotonina (5-HTT/SLC6A4), do receptor 1B de serotonina (HTR1B) e da proteína associada ao sinaptossoma de 25kDa (SNAP25; Gizer et al., 2009; Purper-Ouakil et al., 2011). Os estudos de varredura genômica não têm mostrado resultados consistentes que permaneçam significantes após correções (Lesch et al., 2008; Neale et al., 2008, 2010; Franke et al., 2009; Mick et al., 2010). Por outro lado, esses estudos têm sugerido novos locos candidatos, sendo que os genes candidatos anteriormente considerados para o TDAH não são encontrados entre os principais resultados (Franke et al., 2009). O gene da caderina 13 (CDH13), presente na região cromossômica 16q, codificando uma molécula de adesão celular, destaca-se por ser o único loco com sobreposição entre os diferentes GWAS (Lasky-Su et al., 2008; Lesch et al., 2008; Neale et al., 2008, 2010; Franke et al., 2009; Mick et al., 2010). Genes envolvidos na adesão celular, nos sistemas de comunicação célula-célula e no desenvolvimento e maturação cerebral estão entre os genes sugeridos pelos estudos de varredura genômica do TDAH (Franke et al., 2009).

A presença de comorbidades, além dos sintomas básicos do transtorno, é muito comum em adultos com TDAH. Estima-se que as taxas de comorbidades são de 50% para transtornos internalizantes, como transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno depressivo maior (TDM), e 60% para externalizantes, como transtorno de personalidade antissocial (TPAS), transtorno de humor bipolar (THB), transtorno opositor desafiante (TOD), transtorno de conduta (TC) e abuso/dependência de substâncias (Nutt et al., 2007; Taurines et al., 2010). Em alguns casos o início dos transtornos comórbidos coincide com o período no qual os sintomas do TDAH atingem um nível significativo clinicamente, porém a maioria das comorbidades ocorre mais tarde, principalmente durante adolescência e idade adulta (Taurines et al., 2010).

1.4 TDAH e Tabagismo

O TDAH e o tabagismo estão fortemente relacionados, sendo que o TDAH é considerado um fator de risco para o uso de substâncias em geral (Biederman et al., 1998; Ohlmeier et al., 2007; van Emmerik-van Oortmerssen et al., 2012). Crianças com TDAH, quando chegam à adolescência, têm um maior risco para desenvolverem transtornos de abuso ou dependência de álcool, nicotina, drogas ilícitas como cocaína e maconha, e outras substâncias, quando comparadas com aquelas sem o transtorno (Tercyak et al., 2002; Wilens et al., 2008; Lee et al., 2011). Especificamente, a probabilidade de pacientes com TDAH tornarem-se tabagistas é três vezes maior (Tercyak et al., 2002). Além disso, indivíduos com TDAH iniciam o uso de nicotina mais precocemente, são mais propensos à transição de experimentação para uso regular, consomem maiores quantidades de tabaco, apresentam uma dependência mais grave, maior intensidade dos sintomas de abstinência e maior dificuldade para cessar o uso (Tercyak et al., 2002; McClernon and Kollins, 2008; Wilens et al., 2008; Glass and Flory, 2010; Gray et al., 2010; Matthies et al., 2013). O tabagismo também é um fator de risco significativo para o desenvolvimento da dependência de outras drogas, particularmente em jovens com TDAH, sendo o tabaco considerado por muitos autores como uma porta de entrada para outros tipos de substâncias (Biederman et al., 2006; Ohlmeier et al., 2007; Wilens et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos na relação entre o tabagismo e o TDAH ainda não estão bem estabelecidos, e diversas hipóteses têm sido propostas na tentativa de compreender

essa relação (McClernon and Kollins, 2008; Glass and Flory, 2010). Uma das hipóteses considera que pode haver um mecanismo comum para as duas condições, na qual compartilham um mesmo sistema de neurotransmissão. Como mencionado anteriormente, o TDAH é associado com uma alteração da transmissão DAérgica e a nicotina, através dos receptores nicotínicos, pode modular a atividade DAérgica. Sendo assim, o uso da substância pode ser mais recompensador para indivíduos com TDAH devido às diferenças na transmissão de DA e ser um fator importante para reforçar o uso contínuo da substância (Milberger et al., 1997; McClernon and Kollins, 2008).

Déficits neuropsicológicos são comuns em crianças e adultos com TDAH (Schoechlin and Engel, 2005; Lambek et al., 2011; Biederman et al., 2012), sendo que prejuízos na atenção, na memória e na inibição comportamental são características relevantes nesses pacientes (Hervey et al., 2004). Adultos com TDAH apresentam, em média, escores um pouco mais baixos no QI (quociente de inteligência) e em outros testes cognitivos se comparados a adultos sem o transtorno (Schoechlin and Engel, 2005; Bridgett and Walker, 2006; Advokat, 2010; Silva et al., 2013). Dessa forma, existe uma hipótese sugerindo que indivíduos com desempenho cognitivo que em determinados aspectos pode ser sutilmente diferente seriam mais suscetíveis ao possível efeito estimulante da nicotina no SNC. Este efeito proporcionaria uma melhora na atenção, em processos cognitivos, no humor e no controle de impulsos (Day et al., 2007; Ohlmeier et al., 2007; McClernon and Kollins, 2008; Potter and Newhouse, 2008; Winterer et al., 2010). Esse é o princípio da hipótese da automedicação, muito citada para explicar as altas taxas de tabagismo em pacientes com TDAH. Nessa perspectiva, os pacientes com TDAH fariam uso da nicotina como uma forma de aliviar os sintomas do transtorno. Entretanto, essa teoria não é amplamente aceita, pois alguns estudos não puderam evidenciar qualquer melhora cognitiva vinculada ao tabagismo (Whalen et al., 2003; Dinn et al., 2004; Lambert, 2005; Wilens et al., 2007; Potter and Newhouse, 2008). Além disso, a exposição à nicotina durante a adolescência pode ter um efeito oposto em longo prazo sobre a cognição na vida adulta, acarretando permanentes déficits na atenção e no controle de impulsos (Counotte et al., 2009) além de um aumento do risco para a depressão e ansiedade (Boden et al., 2010; Flensburg-Madsen et al., 2011; Mojtabai and Crum, 2013; Moylan et al., 2013), que podem estar associadas a prejuízos cognitivos (Steffens et al., 2006; Beaudreau and O'Hara, 2008).

Estudos têm avaliado também se as dimensões de sintomas do TDAH – desatenção vs. hiperatividade/impulsividade – e a gravidade dos sintomas têm impactos diferentes no risco de desenvolvimento do tabagismo nesses pacientes. De acordo com Rodriguez et al. (2008) as dimensões de sintomas do transtorno podem estar relacionadas diferentemente com o tabagismo de acordo com o período do desenvolvimento. Na adolescência, os sintomas de desatenção podem ser mais importantes para o desenvolvimento da dependência, enquanto que na idade adulta as duas dimensões de sintomas são importantes (Rodriguez et al., 2008). Diversos estudos sugerem que os sintomas de desatenção estão mais relacionados com um aumento significativo do uso de nicotina ao longo do tempo (Tercyak et al., 2002; Molina and Pelham, 2003; Abrantes et al., 2005; Burke et al., 2007). No entanto, há também estudos demonstrando a importância de ambos os sintomas, desatenção e hiperatividade/impulsividade, na suscetibilidade ao tabagismo (Kollins et al., 2005; Fuemmeler et al., 2007; Upadhyaya and Carpenter, 2008; Wilens et al., 2008). Segundo Kollins et al. (2005) a gravidade dos sintomas tem um papel importante na relação entre TDAH e tabagismo, sendo que quanto maior o número de sintomas do TDAH maior a probabilidade do paciente fazer uso regular da substância. Além disso, pacientes do subtipo combinado iniciam o uso de nicotina mais precocemente e em maiores quantidades (Kollins et al., 2005).

A presença de outros transtornos psiquiátricos em pacientes com TDAH, também tem sido relacionada com maior risco para o tabagismo em adolescentes e adultos. Entre as comorbidades mais relacionadas com o TDAH e o tabagismo estão: transtorno depressivo maior (TDM; Rohde et al., 2004; Dierker et al., 2006), transtorno de ansiedade generalizada (TAG; Dierker et al., 2006), transtorno de conduta (TC; Flory et al., 2003; Dierker et al., 2006; Biederman et al., 2008), transtorno de personalidade antissocial (TPAS; Rohde et al., 2004; Glass and Flory, 2010) e transtorno opositor desafiante (TOD; Rohde et al., 2004; Dierker et al., 2006; Glass and Flory, 2010).

As dimensões de temperamento – tais como as propostas por Cloninger et al. (1993) - procura por novidades, evitação de danos, dependência de recompensa e persistência - também têm sido relacionadas com o TDAH e o tabagismo. Escores mais elevados em procura por novidades mostraram-se associados com o tabagismo (Pomerleau et al., 1995; Etter et al. 2003). Além disso, há estudos mostrando que indivíduos com TDAH tabagistas apresentam escores significativamente mais elevados de procura por

novidade do que indivíduos somente com TDAH ou somente tabagistas sugerindo um efeito adicional da associação desses dois transtornos com a variável do temperamento (Downey et al., 1996; Tercyak and Audrain-McGovern, 2003).

Outro mecanismo potencialmente relevante na associação entre TDAH e tabagismo é o da desinibição comportamental, a qual tem sido caracterizada como uma vulnerabilidade generalizada para transtornos externalizantes como TDAH, transtorno por uso de substâncias (TUS), TC e TPAS (Young et al., 2009). Dinn et al. (2004) encontraram escores elevados de hiperatividade, impulsividade, procura por novidades e diagnóstico de TPAS associados com o tabagismo. Assim como Sousa et al. (2011) observaram uma maior frequência de TUS e TPAS, além de escores elevados de procura de novidades e baixos de evitação de dano em pacientes com TDAH usuários de nicotina. Dessa maneira um perfil de temperamento, comorbidade psiquiátrica e personalidade reduziram a capacidade de antecipar as consequências nocivas em longo prazo do uso do tabaco, priorizando o prazer imediato relacionado ao uso de nicotina.

A influência social (ter amigos ou familiares tabagistas, morar com algum fumante) é um importante preditor do tabagismo na adolescência e início da idade adulta (Glass and Flory, 2010). Estudos sugerem que os fatores sociais estão relacionados com as altas taxas de tabagismo entre pacientes com TDAH, sendo que estes seriam mais vulneráveis à influência social do tabagismo do que a população geral. Assim, a convivência com pessoas que fumam pode influenciar o paciente com TDAH no desenvolvimento de seus próprios hábitos tabagistas (Tercyak et al., 2002; Burke et al., 2007; Kalyva, 2007; Wilens et al., 2008).

1.5 O efeito de substâncias no cérebro

O efeito do tabagismo pode ser diferente entre indivíduos portadores ou não portadores de TDAH. De fato, o estudo das relações entre o uso de nicotina e o TDAH não pode ser dissociado da complexidade e do efeito paradoxal que envolve o efeito de drogas estimulantes no TDAH.

O metilfenidato (MPH), usado no tratamento do TDAH, serve para atenuar os sintomas de hiperatividade/impulsividade, proporcionando um efeito calmante, e os sintomas de desatenção, ajudando na melhora da concentração o que pode resultar em uma

melhora no desempenho cognitivo (Gainetdinov et al., 1999; Cools et al., 2011). Por outro lado, o uso da mesma droga pode provocar euforia, hiperatividade e desatenção em indivíduos sem TDAH, embora alguns estudos tenham mostrado uma melhora cognitiva nesses indivíduos (Napolitano et al., 2010; Del'guidice et al., 2013). Sendo assim, a mesma droga pode ter efeitos opostos de acordo com a população, indivíduos com ou sem TDAH. No entanto, a ação de psicoestimulantes no cérebro de pacientes com TDAH é complexa, sendo que alterações na função de neurotransmissores numa região podem induzir mudanças em outra. O MPH atua preferencialmente no sistema DAérgico, mas também tem ação no sistema noradrenérgico e serotoninérgico, porém com menor afinidade nesse último (Gainetdinov et al., 1999; Del'guidice et al., 2013). Uma hipótese sobre o efeito do MPH na redução dos sintomas do TDAH é que ele aumenta a concentração e memória de trabalho por potenciar os níveis de DA no CPF, enquanto reduz a hiperatividade e impulsividade por atenuar a liberação de DA no *striatum* (Gainetdinov et al., 1999; Clatworthy et al., 2009; Cools et al., 2011). Os mecanismos de autorregulação da DA são menos abundantes no CPF do que no *striatum*, contribuindo para os diferentes níveis do neurotransmissor nessas regiões e seu efeito na redução dos sintomas (Cools et al., 2011).

O uso de estimulantes como o MPH por indivíduos sem TDAH tem aumentado nos últimos anos, principalmente entre estudantes universitários que buscam por maior foco e concentração durante os estudos, melhora no desempenho acadêmico ou para induzir euforia (Herman et al., 2011). No entanto, em indivíduos sem déficits cognitivos o MPH não apresenta muitos benefícios, sendo que se observou que o MPH não atua como um potencializador cognitivo eficaz (Lakhan and Kirchgessner, 2012). O efeito do MPH é mais efetivo em indivíduos que apresentam um desempenho mais baixo agindo na correção de déficit prévios, como indivíduos com TDAH (Lakhan and Kirchgessner, 2012). Os estudantes diagnosticados com TDAH frequentemente mostravam melhores desempenhos em tarefas neuropsicológicas quando medicados, comparado com os resultados de quando não utilizam o medicamento e com pacientes não tratados (Lakhan and Kirchgessner, 2012; Advokat and Scheithauer, 2013).

O tabagismo é um fator ambiental que tem impacto prolongado e possivelmente permanente no cérebro, causando alterações nas conexões nervosas e aumentando o risco de demência e prejuízos cognitivos (DiFranza et al., 2012; Wolock et al., 2013). A ação da nicotina através dos receptores nicotínicos (nAChRs) funciona como um agonista, porém

em concentrações capazes de ativar o receptor ela converte os nAChRs ativos para um estado de dessensibilização o qual fica inativado e não responde à exposição subsequente de agonistas (Bailey et al., 2010; Gould and Leach, 2013). Além disso, devido à ativação prolongada do receptor pelo agonista ocorre uma diminuição na resposta ao estímulo (Ventura et al., 2010). Estudos em animais e autópsias de tecidos em humanos têm mostrado que o aumento no número de nAChRs é outro efeito em resposta ao uso de nicotina, ao contrário de outras drogas, como cocaína e morfina, que levam ao efeito oposto nos receptores (Gould and Leach, 2013; Jasinska et al., 2013). Receptores adicionais seriam necessários para manter a resposta nicotínica dos neurônios, uma vez que os receptores existentes estão no estado inativo devido a dessensibilização. Sendo assim, o maior número de nAChRs proporciona um aumento na ligação da nicotina (Breese et al., 1997). A localização e a composição dos receptores parecem influenciar esse processo, sendo observada uma maior quantidade de receptores nas áreas corticais e no hipocampo comparado com outras áreas cerebrais (Gould and Leach, 2013; Jasinska et al., 2013). A variação no número de receptores não está associada com alterações no mRNA, sendo um evento pós-transcricional, o qual pode refletir uma aceleração na montagem dos nAChRs (Mansvelder and McGehee, 2002; Barik and Wonnacott, 2009). Entretanto, esse processo parece ser reversível, no qual após um período de abstinência (mais de 1 ano) o número de nAChRs voltaria ao seu nível normal, com densidades similares a não fumantes (Breese et al., 1997; Jasinska et al., 2013).

A exposição à nicotina também tem mostrado interagir com diversos genes e modificar a expressão gênica em regiões como córtex pré-frontal e hipocampo (Poleskaya et al., 2007; Wolock et al., 2013). Essa alteração na expressão gênica pode ser resultado das mudanças na plasticidade neuronal em consequência da exposição à nicotina (DiFranza et al., 2012). O estudo de Poleskaya et al. (2007) observou que a nicotina alterou a expressão de 162 genes no cérebro de ratos adolescentes. Além disso, os autores sugeriram que uma única exposição à nicotina pode estimular mudanças em longo prazo. Por outro lado, os achados de Wolock et al. (2013) demonstraram mudanças na expressão de 16 genes que já se mostraram ser relevantes na genética psiquiátrica, sugerindo que esses genes podem predispor uma variedade de comportamentos através de alterações na expressão gênica. As alterações causadas pela nicotina na fisiologia, estrutura e função cerebral, além de mudanças nas respostas comportamentais, podem ocorrer imediatamente

ou em longo prazo e persistem mesmo após a cessação do uso da substância (DiFranza et al., 2012).

Dessa forma, a capacidade da nicotina de usurpar substratos neurobiológicos de aprendizado e de alterar o sistema de memória responsável pela aquisição e ‘gravação’ de memórias de eventos e experiências exercem uma forte influência no desenvolvimento e manutenção da dependência (Gould, 2010; Gould and Leach, 2013). Assim como a plasticidade neuronal, a dessensibilização e o aumento no número de nAChRs parecem contribuir para a tolerância e abstinência da nicotina (Dani and Heinemann, 1996; Gould and Leach, 2013).

1.6 Receptores Nicotínicos

Os receptores nicotínicos (nAChRs) são um subtipo de receptores do sistema colinérgico e foram assim denominados por Dale em 1914 devido a sua afinidade pela nicotina (presente no tabaco), uma substância exógena capaz de ativar esses receptores com alta afinidade (Albuquerque et al., 2009; Ventura et al., 2010). Os nAChRs têm como principal neurotransmissor a acetilcolina (ACh) e estão presentes no SNC, no sistema nervoso periférico e na junção neuromuscular (Albuquerque et al., 2009; Ventura et al., 2010). No SNC, esses receptores regulam uma ampla variedade de processos, tanto fisiológicos como patológicos, estando envolvidos no desenvolvimento neuronal, sono, cansaço, ansiedade, sensação de dor, atividade motora, aprendizado, memória e o sistema de recompensa (Gotti and Clementi, 2004; Hogg and Bertrand, 2004; Gotti et al., 2006; Wu, 2009). Os nAChRs estão localizados principalmente nas porções pré-sinápticas, mas também são encontrados em regiões pós-sinápticas e em dendritos (Barik and Wonnacott, 2009). Os nAChRs pré-sinápticos estimulam a liberação de neurotransmissores, enquanto os nAChRs pós-sinápticos contribuem para a despolarização neuronal (Barik and Wonnacott, 2009; Gould and Leach, 2013). Acredita-se que a função mais importante dos nAChRs no cérebro é modular a liberação de neurotransmissores como a DA, a noradrenalina (NA), a ACh, o glutamato e o GABA (Mihailescu and Drucker-Colin, 2000; Gotti et al., 2009; Brennan et al., 2010).

Os receptores nicotínicos (nAChRs) são proteínas transmembrana e fazem parte da superfamília de canais iônicos (Gotti et al., 2006). Esses receptores são formados por

cinco subunidades organizadas em torno de um poro central e quando ativados permitem o fluxo de íons como Na^+ , Ca^{2+} e K^+ através da membrana celular (Gotti et al., 2009; Wu, 2009). Cada subunidade de nAChR apresenta uma porção amino terminal extracelular onde está localizado o sítio de ligação, três domínios transmembrana hidrofóbicos (M1-M3), um grande loop intracelular, que varia no comprimento dependendo da subunidade e é importante para a regulação da função do receptor, o quarto domínio transmembrana hidrofóbico (M4) e uma pequena sequência C-terminal (Gotti et al., 2009; Brennan et al., 2010). A presença de ligante no sítio de ligação faz com que os domínios de cada subunidade se reorganizem de forma a abrir o poro central e permitir o fluxo de íons por alguns milissegundos, depois disso o receptor se fecha em um estado não condutor (Gotti et al., 2009).

Doze subunidades de nAChR neuronal foram identificadas, sendo nove subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e três β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Apesar da existente possibilidade para formação de nAChRs com muitas combinações diferentes devido a existência de vários tipos de subunidades, parece que os nAChRs são montados em número de combinações relativamente restritas, de acordo com propriedades funcionais e farmacológicas (Mineur and Picciotto, 2008; Schlaepfer et al., 2008; Millar and Gotti, 2009; Wu, 2009). Os sítios de ligação são formados por um componente primário, presente nas subunidades α (com exceção de $\alpha 5$ e $\alpha 10$) e um componente complementar, presente nas subunidades $\beta 2$, $\beta 4$ e $\alpha 7$ - $\alpha 10$. Sendo assim é possível identificar dois subtipos de receptores, os homopentaméricos, quando há apenas um tipo de subunidade ou heteropentaméricos, quando há dois ou mais tipos diferentes de subunidades (Figura 2; Mineur and Picciotto, 2008; Gotti et al., 2009; Wu, 2009). As subunidades β têm um papel importante na estruturação dos receptores, assim como, parecem regular a velocidade na qual os agonistas e antagonistas se ligam e se dissociam dos subtipos de receptores (Duga et al., 2001; Gotti and Clementi, 2004). As subunidades $\alpha 5$ e $\beta 3$ são consideradas acessórias, pois elas não participam diretamente na formação dos sítios de ligação, somente formam receptores funcionais quando expressos com uma subunidade primária e uma complementar ($\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$). Além disso, as subunidades acessórias modificam as propriedades dos receptores em que estão inseridas através de mudanças conformacionais (Barik and Wonnacott, 2009; Gotti et al., 2009; Wang et al., 2009).

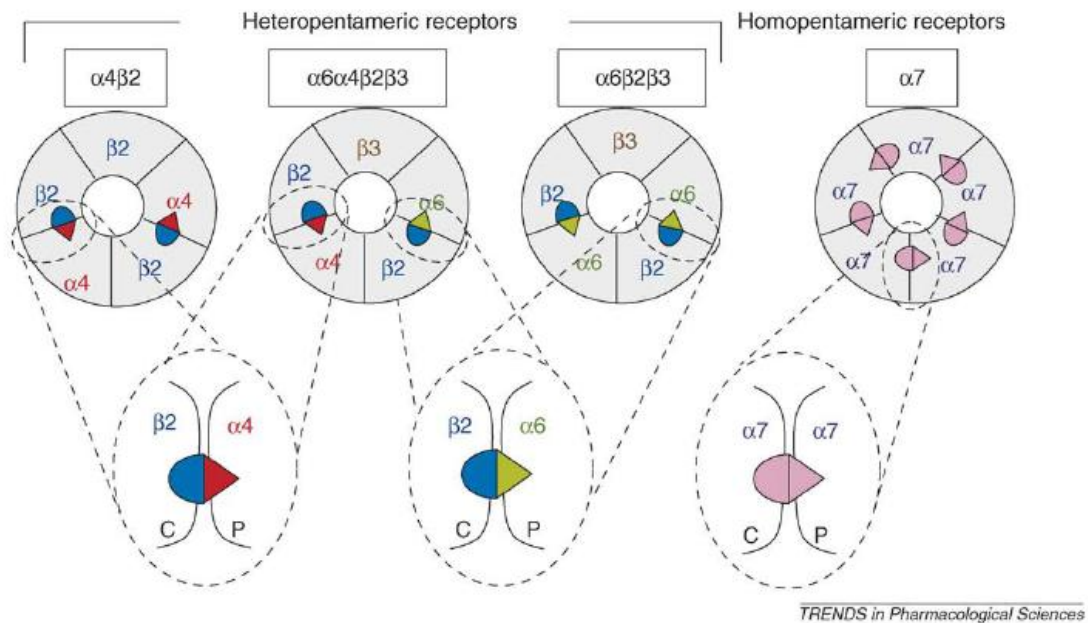


Figura 2: Estrutura e organização dos subtipos heteropentaméricos e homopentaméricos. São apresentados o arranjo pentamérico das subunidades de receptor nicotínico nos subtipos heteropentaméricos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$ e homopentamérico $\alpha 7$ e a localização das interfaces das subunidades para formação do sítio de ligação. O subtipo homopentamérico $\alpha 7$ tem cinco sítios idênticos por receptor (um em cada interface das subunidades). Os receptores heteropentaméricos $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 6\beta 2\beta 3$ tem dois sítios idênticos por receptor, localizado na interface entre as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$, e entre $\alpha 6$ e $\beta 2$, respectivamente. O subtipo $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ tem dois sítios diferentes por receptor, localizados na interface entre as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$, e entre $\alpha 6$ e $\beta 2$. Nos receptores homopentaméricos, a interface inclui lados opostos da mesma subunidade; em receptores heretopentaméricos, a interface está localizada entre duas subunidades adjacentes – uma contendo o componente primário (P) e outro contendo o componente complementar (C) do sítio (Fonte: Gotti e cols. 2006).

Os nAChRs neuronais são importantes durante todas as fases do desenvolvimento, desde a gestação, passando pela infância e adolescência, até a idade adulta, para modular aspectos na maturação cerebral (Dwyer et al., 2009). Durante o desenvolvimento cerebral, principalmente nos períodos em que a maturação é mais sensível a perturbações, é importante a ativação dos nAChRs pela ACh (Dwyer et al., 2009). A expressão dos nAChRs inicia nos primeiros estágios do neurodesenvolvimento e o aumento transitório na expressão desses receptores em estruturas específicas do cérebro frequentemente coincide com a fase mais crítica do desenvolvimento daquela estrutura (Dwyer et al., 2009; Heath and Picciotto, 2009).

O SNC, tanto em roedores quanto em humanos, inicia o desenvolvimento durante o período pré-natal. Neste período, surgem os grupos de células neuronais e eles começam a formar as primeiras conexões sinápticas. A estimulação dos nAChRs é importante para a maturação de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos (Maggi et al., 2003; Liu et al., 2006). A sinalização inadequada do GABA pode modificar a proliferação e migração celular e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento de neurônios em regiões como hipocampo e córtex (Dwyer et al., 2009; Pagani, 2013).

Os nAChRs são fundamentais no período pré-natal para uma organização cerebral adequada, devido a função desses receptores na sobrevivência e orientação celular; para o desenvolvimento inicial do sistema de catecolaminas; e para a formação dos circuitos sensoriais e neurais (Dwyer et al., 2009). No período pós-natal, os nAChRs contribuem para o desenvolvimento de regiões cerebrais como o hipocampo, o córtex e o cerebelo; durante a infância e a adolescência, esses receptores ajudam na maturação do sistema de catecolaminas e no desenvolvimento do sistema límbico. Esses achados apoiam a ideia de que os nAChRs estão envolvidos em muitos processos durante o desenvolvimento cerebral e atuam em diferentes momentos. Essas características são proporcionadas pelas propriedades farmacológicas e fisiológicas individuais de cada subtipo de receptor (Gotti et al., 2006; Dwyer et al., 2009).

Alterações na neurotransmissão colinérgica nicotínica podem influenciar o desenvolvimento cerebral modificando aspectos celulares, fisiológicos e comportamentais, contribuindo para o desenvolvimento de alguma psicopatologia (Heath and Picciotto, 2009; Heath et al., 2010; Muller et al., 2013). Um fator importante que parece contribuir para anormalidades no neurodesenvolvimento é a exposição a substâncias como tabaco durante a gravidez e infância (Mansvelder and McGehee, 2002; Heath and Picciotto, 2009). Exposição ao tabaco na gestação, direta ou indiretamente, e exposição passiva ao fumo (tabagismo secundário) durante a infância estão associados com baixo peso ao nascer, menor crescimento cerebral intrauterino, alterações na morfologia e sobrevivência neuronal e aumento no risco para problemas de neurodesenvolvimento tais como déficits em atenção e memória, dificuldades de aprendizagem e hiperatividade (Mansvelder and McGehee, 2002; Miles and Weden, 2012). A exposição ao tabaco na gestação é considerada um fator importante na suscetibilidade a transtornos psiquiátricos e mostra um

risco de 2-4 vezes maior para o TDAH e abuso de substâncias (Linnet et al., 2003; Button et al., 2007).

A nicotina pode ocupar os sítios de ligação dos receptores ao invés da ACh e assim resultar em uma sinalização colinérgica anormal. A droga também parece alterar a expressão de genes do sistema DAérgico, serotoninérgico e adrenérgico. Sendo assim, eventos regulados pela ACh no desenvolvimento cerebral podem ser interrompidos e provocar um desenvolvimento neuronal irregular (Mansvelder and McGehee, 2002; Heath and Picciotto, 2009). Estudos em animais demonstraram que ratos expostos à nicotina durante o desenvolvimento mostram alterações no sistema dopaminérgico e sintomas de hiperatividade (Heath and Picciotto, 2009). As mudanças causadas pela nicotina nos circuitos responsáveis pela cognição, motivação e hiperatividade podem não ser percebidas até a completa maturação dessas áreas durante a infância e adolescência, que é, na verdade, o período no qual os sintomas do TDAH, por exemplo, são identificados em humanos e em animais de laboratório (Dwyer et al., 2009). Além disso, o uso ou exposição à nicotina na adolescência está associado com uma menor resposta dos nAChRs ao uso da substância na vida adulta. Assim, os efeitos em longo prazo podem comprometer funções cognitivas e contribuir para o desenvolvimento da dependência e de transtornos psiquiátricos através da desregulação dos sistemas límbico e de recompensa (Gould and Leach, 2013).

1.6.1 O Complexo Gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4

O complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 codifica as subunidades $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$ dos nAChRs, respectivamente. Os genes CHRNA5 e CHRNA3 são transcritos em direções opostas, sendo que o CHRNA4 é transcrito na mesma direção do CHRNA3 (Figura 3; Duga et al., 2001; Schlaepfer et al., 2008). Esse complexo gênico está localizado na região cromossômica 15q25 e parece ser conservado em outras espécies de vertebrados, sendo que a localização proximal desses genes sugere uma regulação comum no processo evolutivo (Rana et al., 2009).

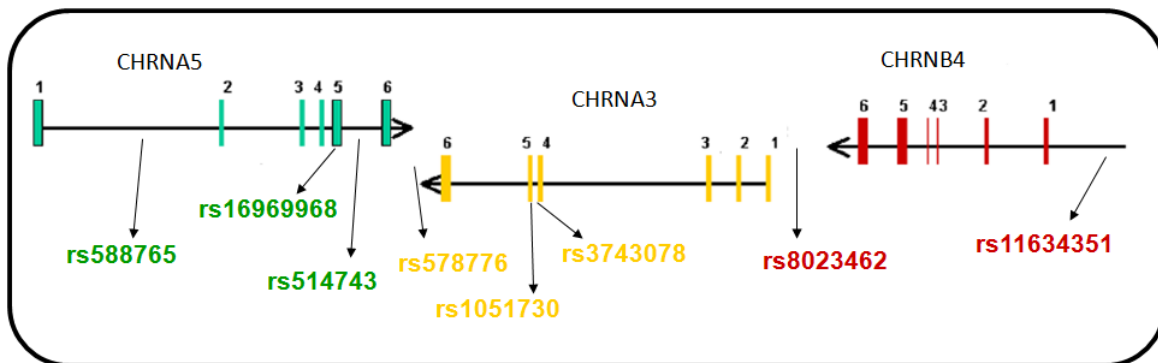


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4. Os retângulos representam os éxons separados pelos introns. Oito polimorfismos foram genotipados no complexo gênico e são apresentados pelos seus números de sequência de referência (rs) e indicados de acordo com a localização no gene (adaptado de Schlaepfer e cols. 2008).

Esse complexo tem sido alvo de muitos estudos e parece ser importante para estudos relacionados a transtornos que envolvem características do comportamento. Essa região tem sido apontada em diversos GWAS como importante na suscetibilidade ao tabagismo (Thorgeirsson et al., 2008, 2010; Furberg et al., 2010; Liu et al., 2010 David et al., 2012), ao câncer de pulmão (McKay et al., 2008; Wang et al., 2008; Landi et al., 2009) e na regulação da função pulmonar (Soler Artigas et al., 2011; Hancock et al., 2012). A região 15q25 é o sinal mais importante de GWAS na suscetibilidade ao tabagismo entre os transtornos psiquiátricos (Hindorff et al. - A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies; www.genome.gov/gwastudies). Além disso, os estudos de genes candidatos têm corroborado com os resultados de GWAS e mostrado um papel do complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 em fenótipos relacionados ao tabagismo (Bierut et al., 2008; Schlaepfer et al., 2008; Stevens et al., 2008; Chen et al., 2009; Freathy et al., 2009; Saccone et al., 2009b; Sherva et al., 2010; Marques-Vidal et al., 2011; Sarginson et al., 2011; Broms et al., 2012; Kapoor et al., 2012), assim como dependência de álcool (Wang et al., 2009; Sherva et al., 2010), dependência de cocaína (Gruza et al., 2008; Sherva et al., 2010), câncer de pulmão (Amos et al., 2008; Hung et al., 2008; Le Marchand et al., 2008; Sasaki et al., 2010), esquizofrenia (Hong et al., 2011; Jackson et al., 2013), transtorno bipolar (Jackson et al., 2013), idade de início da doença de Parkinson (Greenbaum et al., 2013) e comportamento externalizante (Stephens et al., 2012).

A subunidade $\alpha 5$, como citado anteriormente, é uma subunidade acessória e não participa na formação dos sítios de ligação, entretanto, modifica as propriedades dos receptores em que está inserida. Quando presente em receptores dos subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, a subunidade $\alpha 5$ promove uma maior permeabilidade de Ca^{2+} e um aumento na taxa de dessensibilização do receptor (Flora et al., 2000; Gotti and Clementi, 2004; Barik and Wonnacott, 2009; Gotti et al., 2009).

A subunidade $\alpha 3$ é geralmente coexpressa com a subunidade $\beta 4$ e os receptores do subtipo $\alpha 3\beta 4^*$ (onde * indica uma subunidade em potencial desconhecida) são expressos em áreas cerebrais específicas, como o complexo habenular (principalmente habenula medial – MHb), o nucleus interpeduncular (IPN) e os gânglios autônomos. Esse subtipo de receptor tem uma menor afinidade por nicotina comparado a $\alpha 4\beta 2$, no entanto, nAChRs $\alpha 3\beta 4^*$ mantêm a sensibilidade de acordo com os níveis de nicotina dos fumantes, contribuindo para a dependência (Frahm et al., 2011).

O complexo habenular contém uma alta concentração de nAChRs contendo as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 4$ e é subdividido em habenula medial (MHb) e habenula lateral (LHb). A habenula recebe projeções de diversas regiões do sistema límbico (CPF, amígdala e *nucleus accumbens*) e está envolvida na regulação da transmissão DAérgica, serotoninérgica e colinérgica (Heldt and Ressler, 2006; Lecourtier and Kelly, 2007). A MHb emite projeções para o nucleus interpeduncular (IPN) que contém altos níveis de nAChRs, promovendo liberação de ACh diretamente nessa área (Lecourtier and Kelly, 2007). Recentemente, foi observado que os nAChRs contendo as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\beta 4$ presentes na via habenulo-IPN parecem contribuir com o efeito reforçador da nicotina e com os sintomas de abstinência (Kobayashi et al., 2013).

Estudos em camundongos *knockout*, que não expressam a subunidade $\alpha 5$, mostraram que os camundongos *knockout* consomem maiores quantidades de nicotina comparado com camundongos selvagens, sugerindo que os nAChRs do subtipo $\alpha 5^*$ da via habenulo-IPN têm um papel importante no controle da ingestão de nicotina (Fowler et al., 2011; Frahm et al., 2011). Além disso, lesões do complexo habenular em roedores demonstraram um papel importante desse complexo na aprendizagem, na memória, na impulsividade e na emoção, sugerindo que uma disfunção habenular pode contribuir com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (Heldt and Ressler, 2006; Lecourtier and Kelly, 2007). Kobayashi et al. (2013) observaram um papel crucial da via MHb-IPN no

controle inibitório e cognição, corroborando a ideia do envolvimento dessa via na suscetibilidade a transtornos como TDAH, esquizofrenia e uso de substâncias.

Capítulo II

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

2.1 Justificativas

O tabagismo é um problema de saúde pública e fortemente associado com o TDAH. Como citado anteriormente, pacientes com TDAH apresentam uma prevalência duas vezes maior quando comparados a indivíduos sem o transtorno. Há fortes evidências para um papel dos receptores nicotínicos na etiologia de transtornos relacionados com o uso de tabaco, sendo assim, os genes que os codificam tornam-se candidatos importantes em pesquisas sobre fatores genéticos do tabagismo. Mais especificamente, a associação do complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 com o tabagismo e processos cognitivos foi avaliada em alguns estudos na população geral, mas nunca entre portadores de TDAH. De fato, poucos estudos avaliaram genes que podem estar envolvidos na suscetibilidade ao tabagismo em pacientes com TDAH. Portanto, é importante verificar se as variações genéticas que predisõem o uso de tabaco na população geral são as mesmas entre os pacientes com TDAH, tentando compreender os diferentes mecanismos de suscetibilidade. Outra perspectiva é a de verificar possíveis interações gene x tabagismo em processos cognitivos, considerando as alterações na disponibilidade de receptores nicotínicos provocadas pelo uso da substância. Uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na suscetibilidade ao tabagismo em pacientes com TDAH é importante, pois permitiria melhor compreender mecanismos que pudessem ajudar crianças e adolescentes com ou sem TDAH na prevenção ao tabagismo e outros TUS.

2.2 Objetivo Geral

Estudar as inter-relações entre o complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4, o tabagismo, o TDAH e cognição, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

2.3 Objetivos Específicos

- I. Investigar uma possível associação entre polimorfismos no complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 e o tabagismo em indivíduos com e sem TDAH;
- II. Avaliar os padrões de desequilíbrio de ligação no complexo gênico, identificar os principais haplótipos e verificar sua possível influência sobre o tabagismo;
- III. Avaliar a influência de polimorfismos no complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 no desempenho cognitivo em pacientes com TDAH.
- IV. Investigar como o tabagismo interage com polimorfismos em nAChRs afetando o desempenho cognitivo em pacientes com TDAH.

Capítulo III

Artigo #1

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – NeuroMolecular Medicine

Original Article

ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking

Evelise R. Polina¹, Diego L. Rovaris¹, Lucas A. de Azeredo¹, Nina R. Mota¹, Eduardo S. Vitola², Katiane L. Silva², Paula O. Guimarães-da-Silva², Felipe A. Picon², Paulo Belmonte-de-Abreu^{2,3}, Luis A. Rohde^{2,3}, Eugenio H. Grevet^{2,3}, Claiton H. D. Bau^{1,2}

Author affiliations:

1. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
2. Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil
3. Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telephone: (55-51) 3308-6718

Fax: (55-51) 3308-7311

Abstract

Polymorphisms in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster have been shown to be involved in tobacco smoking susceptibility. Considering that attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) not only increases the risk but may also influence the molecular mechanisms of tobacco smoking, we analyzed the association between polymorphisms in the nicotinic acetylcholine receptor genes (nAChRs) and tobacco smoking among individuals with or without ADHD. The sample included 1118 subjects divided into four groups according to smoking status and ADHD diagnosis. Our results demonstrate that the minor alleles of two polymorphisms (rs578776 and rs3743078) in the CHRNA3 gene are associated with an increased risk for tobacco smoking only among patients with ADHD. These alleles have been shown in previous studies to be protective factors for smoking in subjects without ADHD. These findings add to existing evidence that ADHD may exert an important modifying effect on the genetic risk for smoking and should be considered in tobacco smoking association studies.

Keywords: addiction, attention, comorbidity, genetics, hyperactivity, nicotine

Introduction

Tobacco smoking is a heterogeneous condition with substantial comorbidity with other psychiatric disorders. The prevalence of smoking in patients with several mental disorders, including attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), schizophrenia, depression, bipolar disorder and alcohol dependence, is higher when compared to the general population (Aubin et al. 2012; Morisano et al. 2009). In particular, the diagnosis of ADHD is associated with a significantly increased risk for tobacco smoking (Bukstein 2012) which in turn is associated with various psychiatric (Sousa et al. 2011) and neuropsychological (Kalil et al. 2008) characteristics among patients with ADHD. There is also evidence that ADHD symptoms may modify the role of dopamine receptor genetic variations in the susceptibility to smoking behavior (Bidwell et al. 2012; McClernon et al. 2008).

Among the substances of abuse, nicotine is unique in the sense that it binds to specific receptors expressed in the entire brain, bestowing different pharmacological and physiological properties to each receptor due to the large number of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits (Gotti and Clementi, 2004). nAChRs are ligand-gated ion channels that consist of five transmembrane subunits (Gotti et al. 2009). The activation of nAChRs can cause the depolarization of the membrane, resulting in neuronal excitation, and also modulates the release of dopamine and nondopaminergic neurotransmitters, such as GABA/glutamate, noradrenaline and acetylcholine (Gotti et al. 2009; Mihailescu and Drucker-Colin, 2000). Interestingly, the main neuroadaptive changes associated with smoking involve the dopaminergic system (Martin-Soelch 2013), which is central in ADHD susceptibility and treatment (Wang et al. 2013). More specifically, chronic nicotine

use is associated with increases in dopamine release and reduced dopamine transporter (DAT) availability (Martin-Soelch 2013).

Several genome-wide association studies (GWAS) have implicated the 15q25 region, especially the *CHRNA3* gene, as playing an important role in the susceptibility to smoking behavior (David et al. 2012; Furberg et al. 2010; Liu et al. 2010; Thorgeirsson et al. 2008; Thorgeirsson et al. 2010). The finding appears to be one of the most convincing signals in psychiatric disorders (A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies; www.genome.gov/gwastudies). This region includes the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster that encodes the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 5$, $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits. Candidate gene studies have also supported a role of the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster in different smoking behaviors, such as nicotine dependence (Bierut et al. 2008; Broms et al. 2012; Chen et al. 2009; Marques-Vidal et al. 2011; Saccone et al. 2009a; Saccone et al. 2009b; Sherva et al. 2010), early age of initiation (Broms et al. 2012; Kapoor et al. 2012; Schlaepfer et al. 2008; Weiss et al. 2008), heavy smoking (Sarginson et al. 2011; Stevens et al. 2008) and continuing smoking during pregnancy (Freatly et al. 2009).

Despite the pivotal role of nAChRs in tobacco smoking susceptibility and the evidence indicating a modifying effect of ADHD on smoking risk, only one study analyzed nAChRs polymorphisms and smoking among patients with ADHD in the *CHRNA6-CHRNA3* gene cluster (Lee et al. 2013), and no association studies have been conducted with the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster. The present study analyzes the effect of *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* polymorphisms in tobacco smoking susceptibility among subjects with or without ADHD.

Material and methods

Subjects

The total sample was composed of 1118 subjects divided into four groups according to smoking status and ADHD diagnosis. There were 209 smokers with ADHD, 282 non-smokers with ADHD, 113 smokers without ADHD and 514 controls.

The patients with ADHD were from the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The inclusion criteria were as follows: (a) native Brazilians of European descent (b) aged 18 years or older and (c) fulfillment of the diagnostic criteria for ADHD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994), both currently and during childhood. The exclusion criteria were as follows: (a) evidence of clinically significant neurologic diseases that might affect cognition (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma and multiple sclerosis), (b) current or past history of psychosis and (c) intelligence quotient (IQ) ≤ 70 . The semi-structured interviews K-SADS-E (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version), adapted to adults, was used to evaluate ADHD and oppositional defiant disorder (ODD) (Mercadante et al. 1995; Grevet et al. 2005). The Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-IV-R) was used for the Axis I psychiatric disorders and Mini-International Psychiatric Interview (MINI) for the diagnosis of antisocial personality disorder. Approximately 20% of patients had used methylphenidate in their lifetime, and 6% were under current use of this medication when included in the study.

The group of smokers without ADHD and controls were evaluated in a blood donation center in the same hospital as the ADHD patients and matched for several demographic variables. The inclusion criteria included being both a native Brazilian of

European descent and 18 years of age or older. The exclusion criteria were the same as those used for the ADHD patients (mentioned above), as well as the fulfillment of a DSM-IV ADHD diagnosis (American Psychiatric Association, 1994). ADHD was evaluated with the Adult ADHD Self-Report Scale screener – ASRS-v1.1 (Kessler et al. 2005) and other psychiatric diagnoses with the Structured Clinical Interview for DSM-IV screening module - SCID-I/P for the Axis I psychiatric disorders (First et al. 2002).

The criterion for smoking was current or past daily use of tobacco for at least one month. Daily smoking is strongly related to nicotine dependence, as the daily smoking habit usually begins when the dependence is already established (Mayhew et al. 2000; Wellman et al. 2004). The Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) was used to assess dependence severity (Heatherton et al. 1991). The control group comprises individuals that did not fulfill the criteria defined for smoking (daily use of tobacco for at least one month).

The population in Southern Brazil where this study was performed is mainly of European descent, and population structure was not found in the European derived population of Rio Grande do Sul (Salzano and Bortolini, 2002; Zembrzuski et al. 2006). Individuals from Southern Brazil show predominantly European ancestry (94%) according to estimates of interethnic admixture (Santos et al. 2010; Zembrzuski et al. 2006), making errors due to population stratification unlikely (Hutchison et al. 2004). Moreover, a morphological classification based on skin color and morphological traits was also used to select the participants, rather than considering only a self-classification of ethnicity. In addition, we did not include in the sample individuals who reported having grandparents of non-European origin. All individuals who were sampled signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Laboratory methods

DNA was extracted from the peripheral blood, following the method described by Lahiri and Nurnberger (1991). In the present study eight polymorphisms were analyzed, three in the *CHRNA5* gene; rs588765 in intron 1, rs16969968 (a nonsynonymous SNP) in exon 5, and rs514743 in intron 5; three in the *CHRNA3* gene; rs578776 in the 3' untranslated region, rs1051730 (a synonymous SNP) in exon 5, and rs3743078 in intron 4; one intergenic polymorphism; rs8023462 between the *CHRNA3* and *CHRNA4* genes; and one in the *CHRNA4* gene; rs11634351 in the 5' untranslated region. All of the polymorphisms were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommended protocol. The polymorphisms were chosen based in minor allele frequency higher than 20%, evidences of functional effect of the SNP and previous association with tobacco behavior and other substance use disorder.

Statistical analysis

The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was evaluated by the chi-square test. Using a P-value threshold of $P < 0.05$ all of the markers were in accordance with HWE considering the total sample. The categorical variables (such as gender, and comorbid psychiatric disorders) were considered potential confounders and tested through stratified analyses using the Mantel-Haenszel method. A confounding effect was considered when the difference between the $OR_{\text{Mantel-Haenszel}}$ and crude OR was greater than 20%. For the continuous variables (such as age and years of schooling), the Mann-Whitney test was used, and a P-value of 0.2 was used as the threshold for inclusion as a covariate in the model (association with the outcome and SNPs). The characterization of the linkage disequilibrium (LD) among polymorphisms of the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene

cluster was performed with the Haploview program (Barrett et al. 2005). The association of tobacco smoking with the SNPs and haplotypes was evaluated by a logistic regression using the PLINK program. An analysis was run with the entire sample, including the interaction term (ADHD x SNP). Considering the interaction pattern, we decided to run the analyses separately for individuals with and without ADHD, in order to have more precise results and the inclusion of specific sets of covariates. The analyses for patients with ADHD included gender and age as covariates, and for subjects without ADHD, age and years of schooling as covariates. The additive effects models were assumed and the direction of the regression coefficient represented the effect of each extra minor allele. Bonferroni correction was applied for individual SNPs and the 10,000 permutation procedure for haplotypes. A logistic regression was run with the ADHD inattentive and hyperactive/impulsive symptom dimensions (number of symptoms in each K-SADS-E dimension) among patients with ADHD. The interaction term (SNP x ADHD symptoms) was included in the model.

Results

The prevalence of smoking is higher among patients with ADHD (42.6%) than in subjects without ADHD (18%). The socio-demographic and psychiatric characteristics of the sample are shown in Table 1.

The model including subjects with and without ADHD showed significant interaction effects between the rs578776 T and rs3743078 G alleles and ADHD on tobacco smoking. The presence of the alleles in ADHD was associated with risk for tobacco smoking (T allele x ADHD: OR=2.57, p=0.001; G allele x ADHD: OR=2.39, p=0.003). No significant effect is present among individuals without ADHD. The other polymorphisms analyzed did not show significant interactions or main effects.

The stratified analyses revealed that the minor alleles of five polymorphisms were nominally associated with tobacco smoking in patients with ADHD. Two of the alleles were associated with smoking (the T allele of rs578776 – OR=1.63, p=0.001; and the G allele of rs3743078 – OR=1.79, p<0.001), while the other three alleles were less frequent among smokers (the T allele of rs588765 – OR=0.73, p=0.029; the T allele of rs514743 – OR=0.69, p=0.012; and the A allele of rs11634351 – OR=0.72, p=0.021). Only the SNPs rs578776 and rs3743078 remained significant (p=0.008 and p=0.001 respectively) after the Bonferroni correction for multiple testing (Table 2).

We did not find any significant associations when analyzed the susceptibility to tobacco smoking in the subjects without ADHD (Table 2). In addition, no associations were observed between the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 SNPs and ADHD (data available upon request).

The analyses with ADHD inattentive and hyperactive/impulsive symptom dimensions showed a nominally significant interaction effect between rs11634351 A allele and hyperactive/impulsive symptoms (A allele x ADHD symptoms: OR=0.85, p=0.029) on tobacco smoking. However, after correction for multiple testing the result did not remain significant. ADHD inattentive symptoms and the other polymorphisms analyzed did not show significant interactions or main effects.

Polymorphisms in the 15q25 region were in strong linkage disequilibrium (LD); all of the SNPs analyzed except for rs11634351 shared a high degree of LD (D' between 0.73 and 1.0; r^2 between 0.13 and 0.95). The LD between rs11634351 and the other seven SNPs was slightly lower (D' between 0.51 and 0.73; r^2 between 0.08 and 0.44). The haplotype analyses identified the CGATGGTG haplotype (rs588765-rs16969968-rs514743-rs578776-rs1051730-rs3743078-rs8023462-rs11634351) as conferring an

increased risk for smoking in patients with ADHD (OR=1.80; $p<0.001$), including the minor alleles of rs578776 and rs3743078 (the T and G alleles, respectively). The opposite variants were found in the TGTCGCCG haplotype, which was less frequent among smokers with ADHD (OR=0.66; $p<0.001$). After 10,000 permutations the CGATGGTG and TGTCGCCG haplotypes remained significant ($p_{EMP}<0.001$ and $p_{EMP}=0.039$ respectively). There were no significant associations between the haplotypes and tobacco smoking among subjects without ADHD (Table 3).

Discussion

Our results suggest that among patients with ADHD there is an association between tobacco smoking and two CHRNA3 SNPs, the T allele of rs578776 and the G allele of rs3743078, reinforcing the role of this gene in tobacco smoking. The haplotype analyses also demonstrate that the CGATGGTG haplotype, with the presence of the T allele in rs578776 and the G allele in rs3743078, is associated with an increased risk for smoking. No significant associations were observed for tobacco smoking in subjects without ADHD.

It is noteworthy that the variants associated with tobacco smoking in the present sample of patients with ADHD have been previously shown to be protective factors for smoking in subjects without ADHD (Bierut et al. 2008; Saccone et al. 2009a; Saccone et al. 2009b; Stevens et al. 2008; Weiss et al. 2008). In fact, the direction of our association findings is consistent with those observed for the CHRNA3 rs578776 and rs3743078 in opioid, alcohol and cocaine dependence (Sherva et al. 2010). These findings are also parallel to reports showing that the presence of hyperactivity/impulsivity symptoms modifies the direction of the association between the DRD2/ANKK1 rs1800497 polymorphism and lifetime smoking (McClernon et al. 2008) and initial reaction to smoking (Bidwell et al. 2012). In addition, Lee et al. (2013) found a gene x ADHD

interaction where subjects with elevated inattention symptoms and the CHRN3 rs13280604 A allele were at higher risk for smoking and smoked a great number of cigarettes across adolescence and young adulthood. Finally, the minor allele of another polymorphism (CHRNA5 rs16969968) in this gene cluster was shown to be both a risk factor for nicotine dependence (Bierut et al. 2008; Chen et al. 2009; Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2009b) and a protective factor for cocaine dependence (Grucza et al. 2008; Sherva et al. 2010).

It has been hypothesized that patients with ADHD tend to use nicotine to increase dopaminergic transmission and compensate for previous deficits (Bukstein, 2012; Volkow et al. 2007), enhancing cognitive function (McClernon and Kollins, 2008; Potter et al. 2006) by a paradoxical or calming effect of the drug. In fact, there are several features that provide motivation for smoking among subjects with and without ADHD, such as social-environmental stimuli (i.e., living with a smoker, having friends or a parent who smoke), cognitive enhancement, and decreased irritability (Glass and Flory 2010; Van Voorhees et al. 2012). However, there is also evidence that some motivations for smoking are different in individuals with or without ADHD. While loss of behavioral control and enhancement in concentration, memory and alertness are motivation for smokers with ADHD, having friends or family who also smoke is motivation for smokers without ADHD (Van Voorhees et al. 2012; Mitchell et al. 2013). Furthermore, in different psychiatric backgrounds, such as subjects with and without ADHD, nAChR subtypes may have distinct contributions for tobacco smoking by altering response to agonist, sensitivity to reward or cognitive processes (Gould and Leach, 2013). Taken together, the complex patterns of the associations between nAChR SNPs and tobacco smoking should inspire

more research considering the ADHD diagnosis and interactions between the nAChRs and ADHD-related candidate genes, such as dopaminergic genes.

The fact that different alleles seem to predispose to tobacco smoking among samples of patients with or without ADHD demonstrate the need for further studies, especially considering the robust evidence of association presented in various GWAS investigations. In addition to association studies with the nAChR genes in other psychiatric phenotypes, there is a need for gene expression studies designed to clarify the putative functional properties of these alleles.

Incorrect allele identification or genotyping errors should always be considered when complex findings, such as those presented here, are observed. However, the fact that the allele frequencies of the sample included in this study are similar to those reported in other samples of European-descent subjects (Saccone et al. 2009a; Stevens et al. 2008; Wang et al. 2009) make genotyping errors or population stratification unlikely explanations for our findings. The lack of statistical power could be an issue in our inability to replicate the association findings in tobacco smoking among subjects without ADHD. Patients' characteristics, such as dependence severity and comorbidity, could be responsible for the heterogeneity among the findings from different studies. Another limitation of this study is the fact that smoking phenotype was defined by daily use of tobacco for at least one month, instead of diagnostic criteria for nicotine dependence. Therefore, despite the correlation of daily use for at least one month with dependence (Mayhew et al. 2000; Wellman et al. 2004), our results may include individuals that are not dependent.

In conclusion, the present study contributes to existing evidence that the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster plays a relevant, although complex, role in the susceptibility of tobacco smoking and highlights the consideration of the diagnosis of other

psychiatric disorders contributing to an increased prevalence of smoking. Further studies are needed to clarify the role of the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster in tobacco smoking susceptibility in patients with ADHD and other psychiatric disorders. Genetic research on the nicotinic receptors and smoking should consider a comorbid ADHD diagnosis.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), PRONEX and FAPERGS/DECIT/SCTIE/MS/PPSUS.

Disclosure/Conflict of Interest

The author(s) declare the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: Dr. Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire for the last 3 years. He also received travel awards (air tickets and hotel accommodations) for participating in two child psychiatric meetings from Novartis and Janssen-Cilag. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs that were chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies over the last 3 years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. Dr. Belmonte-de-Abreu is on the speaker's bureau or is a consultant for Janssen-Cilag and Bristol-Myers Squibb. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn. American Psychiatric Press, Washington, DC.
- Aubin, H. J., Rollema, H., Svensson, T. H., & Winterer, G. (2012). Smoking, quitting, and psychiatric disease: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, *36*(1), 271-284.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, *21*(2), 263-265.
- Bidwell, L. C., Garrett, M. E., McClernon, F. J., Fuemmeler, B. F., Williams, R. B., Ashley-Koch, A. E., et al. (2012). A preliminary analysis of interactions between genotype, retrospective ADHD symptoms, and initial reactions to smoking in a sample of young adults. *Nicotine Tob Res*, *14*(2), 229-233.
- Bierut, L. J., Stitzel, J. A., Wang, J. C., Hinrichs, A. L., Gruzza, R. A., Xuei, X., et al. (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry*, *165*(9), 1163-1171.
- Broms, U., Wedenoja, J., Largeau, M. R., Korhonen, T., Pitkaniemi, J., Keskitalo-Vuokko, K., et al. (2012). Analysis of detailed phenotype profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res*, *14*(6), 720-733.
- Bukstein, O. G. (2012). Attention deficit hyperactivity disorder and substance use disorders. *Curr Top Behav Neurosci*, *9*, 145-172.

- Chen, X., Chen, J., Williamson, V. S., An, S. S., Hettema, J. M., Aggen, S. H., et al. (2009). Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(7), 926-933.
- David, S. P., Hamidovic, A., Chen, G. K., Bergen, A. W., Wessel, J., Kasberger, J. L., et al. (2012). Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in African Americans. *Transl Psychiatry*, 2, e119.
- Dichter, G. S., Damiano, C. A., & Allen, J. A. (2012). Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *J Neurodev Disord*, 4(1), 19.
- First, M. B., Spitzer, R. L., Gibbon, M., & Williams, J. B. (1998). Structured clinical interview for DSMIV (SCID-I). Biomedics Research Department, New York.
- Freathy, R. M., Ring, S. M., Shields, B., Galobardes, B., Knight, B., Weedon, M. N., et al. (2009). A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) is associated with a reduced ability of women to quit smoking in pregnancy. *Hum Mol Genet*, 18(15), 2922-2927.
- Furberg, H., Kim, Y., Dackor, J., Boerwinkle, E., Franceschini, N., Ardissino, D., et al. (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet*, 42(5), 441-447.
- Glass, K., & Flory, K. (2010). Why does ADHD confer risk for cigarette smoking? A review of psychosocial mechanisms. *Clin Child Fam Psychol Rev*, 13(3), 291-313.

- Gould, T. J., & Leach, P. T. (2013). Cellular, molecular, and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning. *Neurobiol Learn Mem*, doi: 10.1016/j.nlm.2013.08.004.
- Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, 74(6), 363-396.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., et al. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol*, 78(7), 703-711.
- Grevet, E. H., Bau, C. H., Salgado, C. A., Ficher, A., Victor, M. M., Garcia, C., et al. (2005). Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr*, 63(2A), 307-310
- Grucza, R. A., Wang, J. C., Stitzel, J. A., Hinrichs, A. L., Saccone, S. F., Saccone, N. L., et al. (2008). A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry*, 64(11), 922-929.
- Heatherton, T. F., Kozlowski, L. T., Frecker, R. C., & Fagerstrom, K. O. (1991). The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict*, 86(9), 1119-1127.
- Hindorff, L. A., MacArthur, J., Morales, J., Junkins, H. A., Hall, P. N., Klemm, A. K., & Manolio, T. A. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available at: www.genome.gov/gwastudies. Accessed 09 May 2013.

- Hutchison, K. E., Stallings, M., McGeary, J., & Bryan, A. (2004). Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull*, *130*(1), 66-79.
- Kalil, K. L., Bau, C. H., Grevet, E. H., Sousa, N. O., Garcia, C. R., Victor, M. M., et al. (2008). Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res*, *10*(4), 683-688.
- Kapoor, M., Wang, J. C., Bertelsen, S., Bucholz, K., Budde, J. P., Hinrichs, A., et al. (2012). Variants located upstream of CHRNA4 on chromosome 15q25.1 are associated with age at onset of daily smoking and habitual smoking. *PLoS One*, *7*(3), e33513.
- Kessler, R. C., Adler, L., Ames, M., Demler, O., Faraone, S., Hiripi, E., et al. (2005). The World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS): a short screening scale for use in the general population. *Psychol Med*, *35*(2), 245-256.
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, *19*(19), 5444.
- Lee, C. T., Fuemmeler, B. F., McClernon, F. J., Ashley-Koch, A., & Kollins, S. H. (2013). Nicotinic receptor gene variants interact with attention deficient hyperactive disorder symptoms to predict smoking trajectories from early adolescence to adulthood. *Addict Behav*, *38*(11), 2683-2689.
- Liu, J. Z., Tozzi, F., Waterworth, D. M., Pillai, S. G., Muglia, P., Middleton, L., et al. (2010). Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet*, *42*(5), 436-440.

- Marques-Vidal, P., Kutalik, Z., Paccaud, F., Bergmann, S., Waeber, G., Vollenweider, P., et al. (2011). Variant within the promoter region of the CHRNA3 gene associated with FTN dependence is not related to self-reported willingness to quit smoking. *Nicotine Tob Res, 13*(9), 833-839.
- Martin-Soelch, C. (2013). Neuroadaptive changes associated with smoking: structural and functional neural changes in nicotine dependence. *Brain Sci, 3*, 159-176.
- Mayhew, K. P., Flay, B. R., & Mott, J. A. (2000). Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend, 59 Suppl 1*, S61-81.
- McClernon, F. J., Fuemmeler, B. F., Kollins, S. H., Kail, M. E., & Ashley-Koch, A. E. (2008). Interactions between genotype and retrospective ADHD symptoms predict lifetime smoking risk in a sample of young adults. *Nicotine Tob Res, 10*(1), 117-127.
- McClernon, F. J., & Kollins, S. H. (2008). ADHD and smoking: from genes to brain to behavior. *Ann N Y Acad Sci, 1141*, 131-147.
- Mercadante, M.,T., Asbahar, F., Rosário, M.,C., Ayres, A.,M., Karman, L., Ferrari, M.,C., et al. (1995). K-SADS, entrevista semi-estruturada para diagnóstico em psiquiatria da infância, versão epidemiológica. FMUSP, São Paulo.
- Mihailescu, S., & Drucker-Colin, R. (2000). Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch Med Res, 31*(2), 131-144.
- Mitchell, J. T., McIntyre, E. M., McClernon, F. J., & Kollins, S. H. (2013). Smoking Motivation in Adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Using the

Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives. *Nicotine Tob Res*, doi: 10.1093/ntr/ntt144.

Morisano, D., Bacher, I., Audrain-McGovern, J., & George, T. P. (2009). Mechanisms underlying the comorbidity of tobacco use in mental health and addictive disorders. *Can J Psychiatry*, 54(6), 356-367.

Potter, A. S., Newhouse, P. A., & Bucci, D. J. (2006). Central nicotinic cholinergic systems: a role in the cognitive dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder? *Behav Brain Res*, 175(2), 201-211.

Saccone, N. L., Saccone, S. F., Hinrichs, A. L., Stitzel, J. A., Duan, W., Pergadia, M. L., et al. (2009a). Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(4), 453-466.

Saccone, N. L., Wang, J. C., Breslau, N., Johnson, E. O., Hatsukami, D., Saccone, S. F., et al. (2009b). The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res*, 69(17), 6848-6856.

Salzano, F. M., & Bortolini, M. C. (2002). The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge.

Santos, N. P., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Pereira, R., Gusmao, L., Amorim, A., et al. (2010). Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*, 31(2), 184-190.

- Sarginson, J. E., Killen, J. D., Lazzeroni, L. C., Fortmann, S. P., Ryan, H. S., Schatzberg, A. F., et al. (2011). Markers in the 15q24 nicotinic receptor subunit gene cluster (CHRNA5-A3-B4) predict severity of nicotine addiction and response to smoking cessation therapy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B(3), 275-284.
- Schlaepfer, I. R., Hoft, N. R., Collins, A. C., Corley, R. P., Hewitt, J. K., Hopfer, C. J., et al. (2008). The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry*, 63(11), 1039-1046.
- Sherva, R., Kranzler, H. R., Yu, Y., Logue, M. W., Poling, J., Arias, A. J., et al. (2010). Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1921-1931.
- Sousa, N. O., Grevet, E. H., Salgado, C. A., Silva, K. L., Victor, M. M., Karam, R. G., et al. (2011). Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res*, 45(6), 829-834.
- Stevens, V. L., Bierut, L. J., Talbot, J. T., Wang, J. C., Sun, J., Hinrichs, A. L., et al. (2008). Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(12), 3517-3525.
- Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., et al. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 452(7187), 638-642.

- Thorgeirsson, T. E., Gudbjartsson, D. F., Surakka, I., Vink, J. M., Amin, N., Geller, F., et al. (2010). Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet*, 42(5), 448-453.
- Van Voorhees, E., McClernon, F. J., Fuemmeler, B., English, J., Holdaway, A., Hallyburton, M., et al. (2012). An examination of differences in variables maintaining smoking behavior in adult smokers with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. *Addict Res Theory*, 20(1), 72-81.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Newcorn, J., Telang, F., Solanto, M. V., Fowler, J. S., et al. (2007). Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 64(8), 932-940.
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Wigal, T., Kollins, S. H., Newcorn, J. H., Telang, F., et al. (2013). Long-term stimulant treatment affects brain dopamine transporter level in patients with attention deficit hyperactive disorder. *PLoS One*, 8(5), e63023.
- Wang, J. C., Grucza, R., Cruchaga, C., Hinrichs, A. L., Bertelsen, S., Budde, J. P., et al. (2009). Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*, 14(5), 501-510.
- Weiss, R. B., Baker, T. B., Cannon, D. S., von Niederhausen, A., Dunn, D. M., Matsunami, N., et al. (2008). A candidate gene approach identifies the CHRNA5-A3-B4 region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet*, 4(7), e1000125.

Wellman, R. J., DiFranza, J. R., Savageau, J. A., & Dussault, G. F. (2004). Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control, 13*(3), 251-257.

Zembruski, V. M., Callegari-Jacques, S. M., & Hutz, M. H. (2006). Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet, 70*(Pt 6), 822-828.

Tables

Table 1: Socio-demographic and psychiatric characteristics of the participants

	Smokers with ADHD (n=209)	Non-smokers with ADHD (n= 282)	Smokers without ADHD (n= 113)	Controls (n= 514)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Age (years)	36 \pm 11.3	32.1 \pm 10.4	32.1 \pm 9.7	28.5 \pm 8.3
Schooling (years)	13.7 \pm 3.6	14.1 \pm 3.7	12.7 \pm 3.5	13.3 \pm 3.0
Inattention symptoms [#]	7.5 \pm 1.4	7.5 \pm 1.3	0.5 \pm 0.7*	0.9 \pm 1.4*
Hyperactivity/impulsivity symptoms [#]	5.9 \pm 2.5	5.3 \pm 2.7	1.3 \pm 1.8*	1.0 \pm 1.4*
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Gender (% male)	116 (55.5)	142 (50.4)	58 (51.3)	253 (49.2)
Major depressive disorder	73 (34.9)	106 (37.7)	37 (33.0)	135 (26.3)
Generalized anxiety disorder	45 (21.5)	60 (21.4)	14 (12.5)	50 (9.7)
Other substance use disorder	69 (33.0)	26 (9.2)	10 (8.9)	12 (2.3)
	Median (IQR)		Median (IQR)	
Cigarettes per day	15 (5 - 20)	-	11 (7 - 20)	-
FTND score	1 (1 - 5)	-	1 (0 - 4)	-

* Reduced number of individuals with the same scale of patients with ADHD (n= 144).

[#] From the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version (K-SADS-E)

FTND: Fagerström Test for Nicotine Dependence; IQR: Interquartile Range

Table 2: Logistic regression analysis of SNPs in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster with tobacco smoking in subjects with and without ADHD

SNP	Gene	Minor allele	Patients with ADHD					Subjects without ADHD				
			Frequency		Odds Ratio ^b (CI 95%)	P-value	Bonf. ^e	Frequency		Odds Ratio ^c (CI 95%)	P-value	Bonf. ^e
			S ^d	NS ^d				S ^d	NS ^d			
rs588765	CHRNA5	T	30	36	0.73 (0.55-0.97)	0.029	0.230	35	34	1.06 (0.78-1.43)	0.733	1
rs16969968	CHRNA5	A	33	36	0.87 (0.66-1.13)	0.291	1	36	36	1.02 (0.76-1.38)	0.875	1
rs514743	CHRNA5	T	26	34	0.69 (0.15-0.52)	0.012	0.098	31	30	1.06 (0.77-1.46)	0.738	1
rs578776	CHRNA3	T	38	28	1.63 (1.22-2.18)	0.001	0.008^a	31	33	0.87 (0.64-1.19)	0.377	1
rs1051730	CHRNA3	A	32	37	0.83 (0.64-1.09)	0.184	1	37	36	1.03 (0.77-1.40)	0.800	1
rs3743078	CHRNA3	G	38	26	1.79 (1.33-2.40)	0.0001	0.001^a	29	30	0.93 (0.67-1.27)	0.629	1
rs8023462	Intergenic	C	27	33	0.76 (0.57-1.01)	0.062	0.495	31	29	1.10 (0.80-1.52)	0.541	1
rs11634351	CHRNA4	A	34	41	0.72 (0.55-0.95)	0.021	0.166	42	40	1.10 (0.83-1.48)	0.506	1

^aThe models including the entire sample (with and without ADHD, n=1118) showed the same findings, in addition to significant ADHD x SNP interactions on tobacco smoking (rs578776 T allele in ADHD: OR=2.57; CI=1.46-4.53; P=0.001; and rs3743078 G allele in ADHD: OR=2.39; CI=1.35-4.22; P=0.003)

^bGender and age were used as covariates

^cAge and schooling were used as covariates

^dMinor allele frequency (%) in S (smokers) and NS (non-smokers)

^eBonferroni correction

Table 3: Logistic regression analysis of haplotypes in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster with tobacco smoking in subjects with and without ADHD

Patients with ADHD												
Polymorphisms								Frequency				
rs588765	rs16969968	rs514743	rs578776	rs1051730	rs3743078	rs8023462	rs11634351	Smokers	Non-smokers	Odds Ratio ^a	P-value	P _{EMP} ^c
C	A	A	C	A	C	T	A	0.298	0.339	0.81	0.145	0.629
C	G	A	T	G	G	T	G	0.338	0.215	1.80	0.002	0.0006
T	G	T	C	G	C	C	G	0.216	0.293	0.66	0.009	0.039
C	G	A	T	G	G	T	A	0.047	0.051	0.92	0.796	1
C	A	A	C	A	C	T	G	0.042	0.044	0.91	0.787	1
T	G	T	C	G	C	T	G	0.047	0.028	1.59	0.222	0.799
T	G	T	C	G	C	C	A	0.012	0.030	0.39	0.106	0.512
Subjects without ADHD												
Polymorphisms								Frequency				
rs588765	rs16969968	rs514743	rs578776	rs1051730	rs3743078	rs8023462	rs11634351	Smokers	Non-smokers	Odds Ratio ^b	P-value	P _{EMP} ^c
C	A	A	C	A	C	T	A	0.328	0.309	1.14	0.406	0.986
C	G	A	T	G	G	T	G	0.241	0.237	1.01	0.947	1
T	G	T	C	G	C	C	G	0.238	0.248	0.96	0.823	1
C	G	A	T	G	G	T	A	0.047	0.059	0.76	0.455	0.993
C	A	A	C	A	C	T	G	0.031	0.047	0.61	0.245	0.899
T	G	T	C	G	C	T	G	0.045	0.033	1.53	0.290	0.943
T	G	T	C	G	C	C	A	0.035	0.017	2.09	0.104	0.547
T	G	A	T	G	C	T	A	0.018	0.028	0.68	0.477	0.996
C	A	A	C	A	C	C	G	0.017	0.022	1.01	0.990	1

^aGender and age were used as covariates

^bAge and schooling were used as covariates

^cEmpirical p-value based on 10,000 permutations

Capítulo IV

Artigo #2

EM PREPARAÇÃO – Journal of Psychiatric Research

Original Article

A potential reason to avoid smoking in ADHD: an analysis of the impact of variants in CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster in cognitive performance

Evelise R. Polina¹, Diego L. Rovaris¹, Lucas A. de Azeredo¹, Katiane L. Silva², Paula O. Guimarães-da-Silva², Rafael G. Karam², Carlos A. I. Salgado², Melanie J. White⁴, Paulo Belmonte-de-Abreu^{2,3}, Luis A. Rohde^{2,3}, Eugênio H. Grevet^{2,3}, Claiton H. D. Bau^{1,2}

Author affiliations:

1. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
2. Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil
3. Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
4. School of Psychology and Counselling, Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia

Corresponding author: Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telephone: (55-51) 3308-6718

Fax: (55-51) 3308-7311

Abstract

Cognitive processes, such as attention and working memory can be influenced by nicotine through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Polymorphisms in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster have been associated with cognitive and neuropsychological measures in the general population. We analyzed the effect of polymorphisms in nAChRs and how the interaction between nAChRs variants and tobacco smoking relates to cognitive performance in patients with ADHD. 312 adults with ADHD were assessed using the Vocabulary and Block Design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale–Revised (WAIS-R). Our results showed that homozygosity of the minor allele of the polymorphisms rs588765 and rs8023462 were associated with higher and lower scores, respectively. There is also a significant interaction term (rs588765 x smoking) suggesting that the beneficial effect of rs588765 T allele homozygosity seems to be abolished by the use of nicotine. These findings suggest that variants in *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster influence cognitive performance in patients with ADHD and that tobacco smoking may moderate the effect of rs588765 TT genotype.

Keywords: nicotinic receptor, polymorphism, attention, WAIS, nicotine

Introduction

Nicotine, through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), can interfere in neurotransmitter release (e.g. dopamine, serotonin, GABA) and regulate cognitive processes such as attention and working memory (Aubin et al., 2012; Brennan et al., 2010; Gotti et al., 2006; Levin et al., 2006; Wu, 2009). Preclinical evidence suggests that nicotine exposure during adolescence has a detrimental long-term effect on cognition in adulthood, leading to lasting deficits on both attention and impulse control measures (Counotte et al., 2009).

The nAChRs are highly expressed in prefrontal cortex and hippocampus, important brain regions for cognitive functions (Barik and Wonnacott, 2009; Bentley et al., 2011; Gotti and Clementi, 2004; Heishman et al., 2010). These receptors belong to the superfamily of ligand-gated ion channels and are arranged in pentameric combinations of α and β subunits. Twelve subunits have been identified, nine α (α_{2-10}) and three β (β_{2-4}) subunits (Gotti et al., 2009). Emerging evidence suggests a potential role of the nAChR $\alpha 5$ subunit for normal development of prefrontal cortex nicotinic signaling (Bailey et al., 2012) thought to underlie attention deficits observed in mice that lack this subunit ($\alpha 5^{-/-}$ genotype; Bailey et al., 2010). The $\alpha 5$, $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits are encoded by *CHRNA5-CHRNA3-CHRN4* genes that are located on chromosome 15q25. Genome-wide association studies (GWAS; Liu et al., 2010; Thorgeirsson et al., 2008) and candidate gene studies (Bierut et al., 2008; Broms et al., 2012; Sarginson et al., 2011; Schlaepfer et al., 2008; Sherva et al., 2010; Stevens et al., 2008; Weiss et al., 2008) have shown that this region is involved in the susceptibility to smoking behavior.

Polymorphisms in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRN4* gene cluster have also been associated with cognitive and neuropsychological measures. The rs16969968 A allele and

rs1051730 A allele were associated with lower performance in the WAIS similarities subtest, while the rs3743078 C allele was associated with better performance in the object assembly subtest (Winterer et al., 2010). SNPs in the same gene cluster were also associated with lower performance in the Wisconsin Card Sorting Test (WCST). However, when the interaction between the same nAChRs variants and tobacco use was analyzed, the results showed an opposite direction, in which tobacco use contributed to a better performance (Zhang et al., 2010).

In summary, there is evidence that tobacco smoking has a detrimental effect on cognitive performance and that CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster has a role in the susceptibility of smoking behavior. Thus, it is pertinent for research to examine potential mechanisms underlying variants in this gene cluster and smoking on WAIS-R scores. Up to now only one study tested the interaction between nAChRs polymorphisms and smoking on cognitive performance (Zhang et al., 2010), and no studies tested this hypothesis in a sample of patients with ADHD. This is of relevance given the converging evidence that these individuals, based on their profile of cognitive deficits, may be particularly sensitive to any nicotine-related effects on cognition (Day et al., 2007; Newhouse et al., 2004). The present study aims to investigate the impact of CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 polymorphisms in patients with ADHD and how the interaction between nAChRs SNPs and smoking relates to cognitive performance in these patients.

Material and methods

Subjects

The ADHD sample comprises 312 adults from the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The inclusion criteria were (a) native

Brazilians of European descent (b) aged 18 years or older and (c) fulfillment of the diagnostic criteria for ADHD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994), both currently and during childhood. The exclusion criteria were (a) evidence of clinically significant neurologic diseases that might affect cognition (e.g., epilepsy, head trauma, dementia, delirium and multiple sclerosis), (b) current or past history of psychosis and (c) $IQ \leq 70$. ADHD and oppositional defiant disorder (ODD) diagnoses were based on DSM-IV criteria using the respective sections of the Portuguese version of the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children – Epidemiological Version (K-SADS-E) adapted to adults. The Portuguese version of the Swanson, Nolan and Pedham Rating Scale-version IV (SNAP-IV) addressed the severity of current ADHD and ODD symptoms (Swanson, 1992). The scale is based on 0-3 ratings and the scores are computed by summing the scores in items from each dimension (inattention, hyperactivity/impulsivity, and oppositional defiance), divided by the number of items in the dimension. The presence of comorbidities was evaluated with the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-IV-R) for the Axis I psychiatric disorders and with Mini-International Psychiatric Interview (MINI) for the diagnosis of antisocial personality disorder.

The criterion for smoking required the report of daily use of tobacco for at least one month in the lifetime. There is a strong correlation between daily smoking and nicotine dependence, as the daily smoking habit usually begins when the dependence is already established (Mayhew et al., 2000; Wellman et al., 2004; DiFranza et al. 2012). Patients that did not fulfill the criteria defined for smoking (daily use of tobacco for at least one month) comprise the group of non-smokers.

The population in Southern Brazil where this study was performed show predominantly European ancestry (94%) according to estimates of interethnic admixture, making errors due to population stratification unlikely (Hutchison et al., 2004; Santos et al., 2010; Zembrzuski et al., 2006). Moreover, the participants were also selected considering morphological classification based on skin color and morphological traits, rather than considering only a self-classification of ethnicity. In addition, individuals who reported having grandparents of non-European origin were not included in the sample. All individuals who were sampled signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Neuropsychological Assessment

The neuropsychological performance of patients was assessed by trained psychologists. Approximately 20% of patients were under methylphenidate treatment for ADHD and were asked to abstain from the medication for 48 hr before undergoing this evaluation. The Vocabulary and Block Design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale–Revised (WAIS-R) were used to evaluate the cognitive abilities. The WAIS-R is used essentially to evaluate personal strategies for problem solution and specific cognitive deficits. Vocabulary subtest evaluates the premorbid conditions of intelligence, comprehension, learning capacity and general intelligence, while the Block Design subtest measures the speed of execution, capacity of planning and organization, spatial/visual orientation and perceptual integration (Wechsler, 1981).

Laboratory methods

DNA was extracted from the peripheral blood, following the method described by Lahiri and Nurnberger (1991). Eight polymorphisms of the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4

gene cluster were analyzed in the present study, three in the *CHRNA5* gene; rs588765, rs16969968, and rs514743; three in the *CHRNA3* gene; rs578776, rs1051730, and rs3743078; one intergenic polymorphism; rs8023462; and one in the *CHRNA4* gene; rs11634351. A more detailed description of the polymorphisms is described elsewhere (Polina et al., 2013). All of the polymorphisms were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommended protocol. The polymorphisms were chosen based on minor allele frequency higher than 20%, evidence of functional effect of the SNP and previous association with tobacco behavior and other substance use disorder.

Statistical analysis

A multivariate analysis of covariance (MANCOVA) was used to evaluate the effect of polymorphisms and their interaction with tobacco smoking (SNP x tobacco smoking) on Vocabulary and Block Design subtests of the WAIS-R, considering also confounding effects. Variables such as gender, comorbid psychiatric disorders, age and years of schooling, were considered potential confounders. A P-value of 0.2 was used as the threshold for inclusion as a covariate in the model (association with at least one outcome and one SNP). Gender, age, years of schooling and generalized anxiety disorder reached the threshold and were used as covariate in the first model. After that we used a manual backward stepwise elimination procedure with intent to maintain only the significant variables in the final model.

Results

The demographics and lifetime comorbidities of the sample are presented in Table 1. The genotype distributions were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in all polymorphisms analyzed.

The final model of MANCOVA is described in Table 2. The polymorphisms rs588765 and rs8023462 showed statistically significant main effects in the Block Design subtest. Individuals with the rs588765 TT genotype scored higher on Block Design ($P = 0.012$) compared with CT and CC genotypes; while rs8023462 CC homozygous scored lower on Block Design subtest ($P = 0.048$) compared with TC and TT genotypes. In addition, smokers scored lower on Vocabulary subtest ($P = 0.014$) compared with non-smokers. The interaction term rs588765 x smoking showed significant results on Vocabulary subtest ($P = 0.004$). Smokers who are homozygous for the rs588765 minor allele (TT) scored lower on the Vocabulary subtest compared with non-smokers.

Discussion

Our results provide further support to previous studies on the influence of nAChRs polymorphisms on cognitive performance (Rigbi et al., 2008; Winterer et al., 2010; Zhang et al., 2010). Our findings suggest that the SNPs rs588765 and rs8023462 are associated with WAIS-R scores among patients with ADHD. Furthermore, our results also suggest that the effect of rs588765 cognitive profile is influenced by tobacco smoking.

Our findings are consistent with previous evidence that variants in CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 may influence cognition (Winterer et al., 2010). They are also consistent with the demonstration that tobacco smoking modified the association between nAChRs variants and WCST scores (Zhang et al., 2010). In relation to the SNP rs8023462, whose CC genotype was associated with worse performance in the present study, the C

allele was nominally associated with externalizing and delinquent behaviors in a previous study (Stephens et al., 2012). The CHRNA5 rs588765 TT genotype, which performed better in the present study, showed a 2-fold increase in CHRNA5 mRNA expression (Wang et al., 2009). Increased CHRNA5 mRNA expression can contribute to a greater number of $\alpha 5$ -containing nAChRs. Evidences have shown that the presence of $\alpha 5$ subunit, an accessory subunit, in the receptor can increase Ca^{2+} permeability (Barik and Wonnacott, 2009; Gotti et al., 2009), process which modulates neurotransmitter release and synaptic plasticity (Barik and Wonnacott, 2009). It might be hypothesized that an elevated number of $\alpha 5$ -containing nAChRs can increase the availability of neurotransmitter, such as dopamine, and consequently influence cognitive performance.

The apparently positive effect of rs588765 T allele homozygosis on cognitive scores seems to be abolished among smokers. This finding may be a possible explanation for a lower risk to smoking associated with the T allele among patients with ADHD (Polina et al., 2013). It is noteworthy that smoking itself may have a detrimental effect on cognition (Glass et al., 2006; Kalil et al., 2008). Animal studies suggest that aspects of behavioral and physiological response to nicotine may be influenced by genetic factors, in addition to nicotinic receptors expression (Breese et al., 1997). The effect of nicotine depends on the type of nAChRs expressed in the neurons and the location of these neurons (Heishman et al., 2010). The variability observed in cognitive performance may be the cause of individual differences in neuronal pathway (Heishman et al., 2010). Evidence has emerged that long term nicotine exposure may interact with several genes in influencing gene expression in the human frontal lobe, a key brain region involved in cognitive function (Wolock et al., 2013). Gene expression is also altered in the brain of rats during adolescence by nicotine, 162 genes can be affected, some of them showed similar patterns

of gene expression in prefrontal cortex and hippocampus (Poleskaya et al., 2007). Nicotine exposure can induce neuroplastic changes (structure, behavioral, physiology) in the brain that persist even after cessation of nicotine (DiFranza et al., 2012). These changes in brain, immediately and persistently may be the cause of alterations in gene expression (DiFranza et al., 2012). These findings highlight the importance of examining nicotine exposure as a novel brain environmental moderator of gene effects on functions that are dependent on the frontal lobes, such as cognition.

Reduced cognitive performance in smokers, as observed in our findings in patients with ADHD, is consistent with the long-term effects of adolescent smoking observed in adult rodents (Counotte et al., 2009) and was also shown by Hong and colleagues (2011) in a group of patients with schizophrenia. Another scenario where nicotine use seems to be damaging in the long-term is in major depression disorder. Higher scores of depression are reported among current smokers when compared with former smokers (Dos Santos et al., 2010) and ex-smokers reported feeling happier after smoking cessation (Shahab and West, 2009), suggesting that after passing the withdrawal symptoms the patients experience a better mood. Taken together, these results suggest that impaired performance and mood oscillation may be a consequence of chronic smoking, which have harmful effects (Winterer et al., 2010).

Unfortunately, in the present study we could not investigate the effect of age of smoking initiation on WAIS-R scores. This analysis would be relevant considering the evidence that early onset of nicotine use have a stronger detrimental effect (Counotte et al., 2009; Wolock et al., 2013). Another limitation is that our sample comprised current and former smokers and cognitive performance was not assessed during period of smoking of all patients. Despite the evidences that dysfunctional frontal network is observed in both

current and former smoker compared to nonsmokers (Neuhaus et al., 2006) and that brain damages caused by nicotine do not return to their original state after smoking cessation (DiFranza et al., 2012) it would be interesting to evaluate the interaction between nAChRs and smoking in cognitive profile according to current smoking status. Furthermore, the findings presented here cannot be considered valid for subjects without ADHD. Other studies have observed similar findings in the general population (Winterer et al., 2010; Zhang et al., 2010), but these investigations did not analyze specifically SNPs rs588765 and rs8023462, that were particularly informative here. Therefore, it would be important to have exactly the same measures and SNPs in a single study. Further studies are necessary to understand the role of nAChRs SNPs on cognition and how tobacco use interact with polymorphisms in nAChRs and influence performance in subjects with different clinical and neurobiological backgrounds. Brain expression studies specifically targeting this gene region are warranted to examine whether this interaction operates via nicotine-induced alteration on nAChRs in prefrontal brain regions during maturation (i.e., from nicotine exposure during adolescence). It is speculated that such alterations may have greater impact in patients with ADHD, given their pre-existing altered prefrontal functioning and cognitive deficits.

In summary, the current study has provided further evidence that genetic variants on CHRNA5-CHRNA3-CHNRB4 gene cluster influence cognitive performance and that smoking is capable of inhibit the benefits of SNPs within this gene cluster on cognitive function in patients with ADHD.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-PRONEX), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), PRONEX and FAPERGS/DECIT/SCTIE/MS/PPSUS.

References

- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn. Washington: American Psychiatric Press; 1994.
- Aubin HJ, Rollema H, Svensson TH, Winterer G. Smoking, quitting, and psychiatric disease: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36: 271-284.
- Bailey CD, Alves NC, Nashmi R, De Biasi M, Lambe EK. Nicotinic alpha5 subunits drive developmental changes in the activation and morphology of prefrontal cortex layer VI neurons. *Biol Psychiatry* 2012; 71: 120-128.
- Bailey CD, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK. The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J Neurosci* 2010; 30: 9241-9252.
- Barik J, Wonnacott S. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 173-207.
- Bentley P, Driver J, Dolan RJ. Cholinergic modulation of cognition: insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Prog Neurobiol* 2011; 94: 360-388.
- Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, Horton WJ, Breslau N, Budde J, Cloninger CR, Dick DM, Foroud T, Hatsukami D, Hesselbrock V, Johnson EO, Kramer J, Kuperman S, Madden PA, Mayo K, Nurnberger J, Jr., Pomerleau O, Porjesz B, Reyes O, Schuckit M, Swan G, Tischfield JA, Edenberg HJ, Rice JP, Goate AM. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 1163-1171.
- Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC, & Leonard S. Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 7-13.
- Brennan KA, Lea RA, Fitzmaurice PS, Truman P. Nicotinic receptors and stages of nicotine dependence. *J Psychopharmacol* 2010; 24: 793-808.

- Broms U, Wedenoja J, Largeau MR, Korhonen T, Pitkaniemi J, Keskitalo-Vuokko K, Happola A, Heikkila KH, Heikkila K, Ripatti S, Sarin AP, Salminen O, Paunio T, Pergadia ML, Madden PA, Kaprio J, Loukola A. Analysis of detailed phenotype profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res* 2012; 14: 720-733.
- Brooker BH, Cyr JJ. Tables for clinicians to use to convert WAIS-R short forms. *Journal of Clinical Psychology* 1986; 42:983e6.
- Counotte DS, Spijker S, Van de Burgwal LH, Hogenboom F, Schoffemeer AN, De Vries TJ, Smit AB, Pattij T. Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 299-306.
- Day M, Pan JB, Buckley MJ, Cronin E, Hollingsworth PR, Hirst WD, Navarra R, Sullivan JP, Decker MW, Fox GB. Differential effects of ciproxifan and nicotine on impulsivity and attention measures in the 5-choice serial reaction time test. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1123-1134.
- DiFranza JR, Huang W, King J. Neuroadaptation in nicotine addiction: Update on the sensitization-homeostasis model. *Brain Sci* 2012, 2: 523-552;
- Dos Santos VA, Migott AM, Bau CH, Chatkin JM. Tobacco smoking and depression: results of a cross-sectional study. *Br J Psychiatry* 2010; 197: 413-414.
- Glass JM, Adams KM, Nigg JT, Wong MM, Puttler LI, Buu A, Jester JM, Fitzgerald HE, Zucker RA. Smoking is associated with neurocognitive deficits in alcoholism. *Drug Alcohol Depend* 2006; 82: 119-126.
- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 2004; 74: 363-396.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 703-711.

- Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 482-491.
- Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG. Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 210: 453-469.
- Hong LE, Schroeder M, Ross TJ, Buchholz B, Salmeron BJ, Wonodi I, Thaker GK, Stein EA. Nicotine enhances but does not normalize visual sustained attention and the associated brain network in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2011; 37: 416-425.
- Hutchison KE, Stallings M, McGeary J, Bryan A. Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull* 2004; 130: 66-79.
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH, Sousa NO, Garcia CR, Victor MM, Fischer AG, Salgado CA, Belmonte-de-Abreu P. Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 2008; 10: 683-688.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 184: 523-539.
- Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, Berrettini W, Knouff CW, Yuan X, Waeber G, Vollenweider P, Preisig M, Wareham NJ, Zhao JH, Loos RJ, Barroso I, Khaw KT, Grundy S, Barter P, Mahley R, Kesaniemi A, McPherson R, Vincent JB, Strauss J, Kennedy JL, Farmer A, McGuffin P, Day R, Matthews K, Bakke P, Gulsvik A, Lucae S, Ising M, Brueckl T, Horstmann S, Wichmann HE, Rawal R, Dahmen N, Lamina C, Polasek O, Zgaga L, Huffman J, Campbell S, Kooner J, Chambers JC, Burnett MS, Devaney JM, Pichard AD, Kent KM, Satler L, Lindsay JM, Waksman R, Epstein S, Wilson JF, Wild SH, Campbell H, Vitart V, Reilly MP, Li M, Qu L, Wilensky R, Matthaï W, Hakonarson HH, Rader DJ,

Franke A, Wittig M, Schafer A, Uda M, Terracciano A, Xiao X, Busonero F, Scheet P, Schlessinger D, St Clair D, Rujescu D, Abecasis GR, Grabe HJ, Teumer A, Volzke H, Petersmann A, John U, Rudan I, Hayward C, Wright AF, Kolcic I, Wright BJ, Thompson JR, Balmforth AJ, Hall AS, Samani NJ, Anderson CA, Ahmad T, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J, Caulfield M, Munroe PB, Farrall M, Dominiczak A, Worthington J, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 2010; 42: 436-440.

Mayhew KP, Flay BR, Mott JA. Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend* 2000; 59 Suppl 1: S61-81.

Neuhaus A, Bajbouj M, Kienast T, Kalus P, von Haebler D, Winterer G, & Gallinat J. Persistent dysfunctional frontal lobe activation in former smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 186: 191-200.

Newhouse PA, Potter A, Singh A. Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 36-46.

Polesskaya OO, Fryxell KJ, Merchant AD, Locklear LL, Ker KF, McDonald CG, Eppolito AK, Smith LN, Wheeler TL, & Smith RF. Nicotine causes age-dependent changes in gene expression in the adolescent female rat brain. *Neurotoxicol Teratol* 2007; 29: 126-140.

Polina ER, Rovaris DL, de Azeredo LA, Mota NR, Vitola ES, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Picon FA, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CHD. ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking. *Neuromol med* 2013; doi 10.1007/s12017-013-8286-2.

Rigbi A, Kanyas K, Yakir A, Greenbaum L, Pollak Y, Ben-Asher E, Lancet D, Kertzman S, Lerer B. Why do young women smoke? V. Role of direct and interactive effects of nicotinic cholinergic receptor gene variation on neurocognitive function. *Genes Brain Behav* 2008; 7: 164-172.

- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmao L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010; 31: 184-190.
- Sarginson JE, Killen JD, Lazzeroni LC, Fortmann SP, Ryan HS, Schatzberg AF, Murphy GM, Jr. Markers in the 15q24 nicotinic receptor subunit gene cluster (CHRNA5-A3-B4) predict severity of nicotine addiction and response to smoking cessation therapy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2011; 156B: 275-284.
- Schlaepfer IR, Hoft NR, Collins AC, Corley RP, Hewitt JK, Hopfer CJ, Lessem JM, McQueen MB, Rhee SH, Ehringer MA. The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry* 2008; 63: 1039-1046.
- Shahab L, West R. Do ex-smokers report feeling happier following cessation? Evidence from a cross-sectional survey. *Nicotine Tob Res* 2009; 11: 553-557.
- Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, Anton RF, Oslin D, Farrer LA, Gelernter J. Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1921-1931.
- Stephens SH, Hoft NR, Schlaepfer IR, Young SE, Corley RC, McQueen MB, Hopfer C, Crowley T, Stallings M, Hewitt J, Ehringer MA. Externalizing behaviors are associated with SNPs in the CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster. *Behav Genet* 2012; 42: 402-414.
- Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, Thun MJ, Goate A, Calle EE. Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3517-3525.
- Swanson JM. School-based assessments and interventions for ADD students. Irvine: KC Publishing; 1992.

- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsater A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfingsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638-642.
- Wang JC, Grucza R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, Fox L, Goldstein E, Reyes O, Saccone N, Saccone S, Xuei X, Bucholz K, Kuperman S, Nurnberger J, Jr., Rice JP, Schuckit M, Tischfield J, Hesselbrock V, Porjesz B, Edenberg HJ, Bierut LJ, Goate AM. Genetic variation in the *CHRNA5* gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 2009; 14: 501-510.
- Weschler D. *WAIS-R e Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale e Revised*. Cleveland: Psychological Corporation; 1981.
- Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausern A, Dunn DM, Matsunami N, Singh NA, Baird L, Coon H, McMahon WM, Piper ME, Fiore MC, Scholand MB, Connett JE, Kanner RE, Gahring LC, Rogers SW, Hoidal JR, Leppert MF. A candidate gene approach identifies the *CHRNA5-A3-B4* region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000125.
- Wellman RJ, DiFranza JR, Savageau JA, Dussault GF. Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control* 2004; 13: 251-257.
- Winterer G, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Fehr C, Brenner H, Breitling LP, Nitz B, Raum E, Muller H, Gallinat J, Gal A, Heim K, Prokisch H, Meitinger T, Hartmann

AM, Moller HJ, Gieger C, Wichmann HE, Illig T, Dahmen N, Rujescu D. Risk gene variants for nicotine dependence in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 cluster are associated with cognitive performance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B: 1448-1458.

Wolock SL, Yates A, Petrill SA, Bohland JW, Blair C, Li N, Machiraju R, Huang K, Bartlett CW. Gene x smoking interactions on human brain gene expression: finding common mechanisms in adolescents and adults. *J Child Psychol Psychiatry* 2013; 54: 1109-1119.

Wu J. Understanding of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 653-655.

Zembruski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 2006; 70: 822-828.

Zhang H, Kranzler HR, Poling J, Gelernter J. Variation in the nicotinic acetylcholine receptor gene cluster CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 and its interaction with recent tobacco use influence cognitive flexibility. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 2211-2224.

Tables

Table 1: Demographic and psychiatric characteristics of the patients

	ADHD Smokers (n = 135)	ADHD Non-smokers (n = 178)
	Mean ± SD	Mean ± SD
Age (years)	36.2 ± 11.1	32.1 ± 10.8
Schooling (years)	13.4 ± 3.7	13.9 ± 3.7
Inattention symptoms*	7.6 ± 1.2	7.5 ± 1.3
Hyperactivity/impulsivity symptoms*	6.1 ± 2.3	5.1 ± 2.8
SNAP inattention [#]	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.6
SNAP hyperactivity/impulsivity [#]	1.6 ± 0.7	1.4 ± 0.8
	n (%)	n (%)
Gender (% male)	76 (55.5)	86 (48.0)
Primarily inattentive	46 (33.6)	87 (48.6)
Primarily hyperactive/impulsive	6 (4.4)	10 (5.6)
Combined subtypes	85 (62.0)	82 (45.8)
Major depressive disorder	52 (38.0)	70 (39.3)
Generalized anxiety disorder	29 (21.2)	34 (19.1)
Other substance use disorder	39 (28.5)	14 (7.9)

* From the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version (K-SADS-E)

[#] From the Swanson, Nolan and Pedham Rating Scale-version IV (SNAP-IV)

Table 2: Effect of polymorphisms in CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster and tobacco smoking on WAIS-R

	WAIS-R Vocabulary		WAIS-R Block Design	
	Mean (SE)		Mean (SE)	
CHRNA5-rs588765				
CC (n = 134)	102.7 (1.69)	$F_{(2,300)}$ = 2.172 P = 0.116	91.0 (2.37)	$F_{(2,300)}$ = 4.491 P = 0.012
CT (n = 143)	101.3 (1.52)		93.4 (2.13)	
TT (n = 35)	108.5 (2.55)		106.5 (3.58)	
Intergenic-rs8023462				
TT (n = 156)	106.0 (1.48)	$F_{(2,300)}$ = 2.669 P = 0.069	100.8 (2.07)	$F_{(2,300)}$ = 3.071 P = 0.048
TC (n = 125)	107.5 (1.51)		101.6 (2.12)	
CC (n = 31)	99.0 (2.83)		88.4 (3.98)	
Smoking				
No (n = 177)	105.8 (0.85)	$F_{(1,300)} = 6.137$ P = 0.014	98.2 (1.19)	$F_{(1,300)} = 1.918$ P = 0.167
Yes (n = 135)	102.5 (1.20)		95.7 (1.68)	
rs588765-smoking interaction				
Genotype CC in non-smokers (n = 74)	103.8 (1.84)	$F_{(2,300)}$ = 5.622 P = 0.004	93.1 (2.58)	$F_{(2,300)}$ = 1.390 P = 0.251
Genotype CC in smokers (n = 60)	101.7 (1.85)		88.8 (2.61)	
Genotype CT in non-smokers (n = 76)	100.4 (1.67)		93.2 (2.34)	
Genotype CT in smokers (n = 66)	102.2 (1.70)		93.5 (2.38)	
Genotype TT in non-smokers (n = 26)	113.3 (2.69)		108.4 (3.78)	
Genotype TT in smokers (n = 9)	103.6 (3.36)	104.6 (4.73)		

Gender, age, schooling and generalized anxiety disorder were used as covariates

Subscripted numbers in the parenthesis under F values are degree of freedom of groups and degree of freedom of errors, respectively

Capítulo V

DISCUSSÃO GERAL

Os genes que codificam subunidades de receptores nicotínicos parecem ser relevantes na suscetibilidade ao tabagismo, sendo que diversos polimorfismos nesses genes já foram associados com o transtorno (Feng et al., 2004; Greenbaum et al., 2006; Bierut et al., 2007; Ehringer et al., 2007; Stevens et al., 2008). O complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4, especialmente, destacou-se após os resultados de GWAS associá-lo com o tabagismo. A meta-análise de GWAS de Liu et al. (2010), avaliando a quantidade de cigarros por dia, identificou o *locus* CHRNA5-CHRNA3 como o único *locus* significativo no genoma (Liu et al., 2010), reforçando o papel desses genes na suscetibilidade ao tabagismo. Além disso, esse complexo tem sido explorado na suscetibilidade a outros transtornos psiquiátricos, como TDAH, transtorno depressivo maior, transtorno bipolar e esquizofrenia, principalmente devido a sua função na liberação de neurotransmissores e as altas taxas de tabagismo entre os pacientes (Hong et al., 2011; Chen et al., 2012; Jackson et al., 2013). A comorbidade entre os transtornos pode ter consequências negativas na gravidade e na persistência dos sintomas (Swendsen et al., 2010). A combinação de fatores, entre eles genéticos, contribui para o desenvolvimento concomitante desses transtornos devido à etiologia multifatorial. De fato, transtornos psiquiátricos, assim como características de personalidade (busca por novidade, evitação de dano), fortemente associados ao tabagismo, são candidatos para a identificação de interações genéticas complexas (McClernon et al., 2008). Dessa maneira, considerando que tanto os genes de nAChRs como o TDAH têm sido associados independentemente com o risco de tabagismo, os sintomas do TDAH representam um fenótipo relevante que pode influenciar a relação entre genótipo e tabagismo (McClernon et al., 2008; Gould, 2010). Sendo assim, a combinação de alelos específicos e TDAH pode ainda contribuir para a compreensão da maior vulnerabilidade para o tabagismo em alguns pacientes com TDAH (Lee et al., 2013).

A influência genética pode diferir substancialmente na etiologia de doenças complexas (Lin et al., 2007). Portanto, é possível que, na presença de TDAH, certos genótipos funcionem em conjunto para aumentar o risco de tabagismo (Bidwell et al., 2012). Nossos resultados apontam que os alelos rs578776-T e rs3743078-G estão associados com um maior risco para o tabagismo em pacientes com TDAH, variantes anteriormente associadas com menor risco na população geral (Bierut et al., 2008; Stevens et al., 2008; Weiss et al., 2008; Saccone et al., 2009a,b). Dessa forma, esses achados com variantes genéticas do complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 reforçam o papel

do TDAH como um modulador na suscetibilidade ao tabagismo. Apesar de não encontrarmos nenhuma evidência de associação entre polimorfismos em nAChRs e o risco para o tabagismo na população geral, é possível observar um efeito oposto dos alelos estudados em pacientes com TDAH e na população geral. Sendo assim, sugere-se que diferentes mecanismos estão envolvidos na suscetibilidade ao tabagismo na população geral e em pacientes com TDAH. Os principais incentivos para o uso da nicotina podem ser diferentes entre os indivíduos com e sem TDAH, aqueles com o transtorno usam nicotina principalmente para melhorar a cognição e a irritabilidade, por estarem frequentemente expostos aos estímulos do tabagismo e pela perda do controle voluntário sobre o hábito de fumar, enquanto que os indivíduos sem TDAH tornam-se tabagistas principalmente devido ao estímulo socioambiental, sendo influenciados particularmente por familiares e amigos (Van Voorhees e cols. 2012; Mitchell et al., 2013). Portanto, é provável que os circuitos cerebrais envolvidos sejam diferentes entre os indivíduos, considerando que pacientes com TDAH apresentam anormalidades estruturais e funcionais em regiões específicas do cérebro, e o efeito da nicotina depende da rede neuronal, assim como da localização e dos tipos de nAChRs expressos nos neurônios (Heishman et al., 2010; Gould and Leach, 2013).

Receptores nicotínicos também estão envolvidos na regulação de processos cognitivos, visto que eles são amplamente expressos em regiões como córtex pré-frontal e hipocampo, áreas relevantes para atenção e memória (Gotti et al., 2006; Brennan et al., 2010; Heishman et al., 2010). Polimorfismos do complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 já foram associados com desempenho cognitivo em indivíduos da população geral (Winterer et al., 2010; Zhang et al., 2010), e nossos resultados mostram que, embora com diferentes polimorfismos, eles também influenciam a cognição em pacientes com TDAH. O polimorfismo rs588765, no gene CHRNA5, mostrou resultados significativos para a cognição. O alelo T em homozigose foi associado com melhor desempenho cognitivo. Esse mesmo alelo foi nominalmente associado com um menor risco para o tabagismo em pacientes com TDAH. Além disso, o genótipo rs588765 TT parece aumentar a expressão do gene CHRNA5 (Wang et al., 2009). Uma maior quantidade de subunidades $\alpha 5$ disponíveis pode acarretar em um aumento na inserção dessa subunidade no receptor funcional. Dessa forma o receptor, quando ativado, permite um maior fluxo de Ca^{2+} o qual promove uma maior liberação de neurotransmissores e, por consequência, pode

influenciar no desempenho cognitivo (Barik and Wonnacott, 2009; Gotti et al., 2009). Os nAChRs do subtipo $\alpha 5^*$ são amplamente encontrados em regiões envolvidas em processos cognitivos, o que pode favorecer uma melhor resposta (Heldt and Ressler, 2006; Kobayashi et al., 2013; Lecourtier and Kelly, 2007). Entretanto, o efeito desse alelo na cognição parece ser anulado pelo uso de nicotina, sendo observado um pior desempenho cognitivo em indivíduos fumantes com o genótipo TT quando comparado com não fumantes. O efeito protetor desse alelo para o tabagismo pode ser um fator que contribui para o resultado oposto quando na presença de nicotina. Entretanto, o tabagismo pode causar alterações na plasticidade neuronal e também parece influenciar a expressão de alguns genes (DiFranza et al., 2012; Wolock et al., 2013). Dessa forma, será que o tabagismo está alterando o efeito do polimorfismo rs588765 na expressão do gene CHRNA5 e assim anulando a resposta positiva no desempenho cognitivo? Infelizmente, o complexo gênico CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 não foi incluído nos estudos que avaliaram o efeito do tabagismo na expressão gênica (Polesskaya et al., 2007; Wolock et al., 2013). A influência do tabagismo na expressão desses genes pode contribuir para um melhor entendimento do seu efeito no desempenho cognitivo. O tabagismo provoca diversas alterações nas conexões nervosas, sendo assim, pode alterar a resposta à nicotina em regiões importantes para a cognição resultando em prejuízos cognitivos. Outra possibilidade é que o uso prolongado da substância e a quantidade administrada podem estar acentuando os déficits cognitivos (Wagner et al., 2013). Estudos têm mostrado um baixo desempenho de tabagistas em testes que avaliam a atenção visual e a impulsividade e maior frequência de sintomas de TDAH comparado com não tabagistas (Kollins et al., 2005; Leach et al., 2013; Wagner et al., 2013; Weiser et al., 2010).

A presença de transtornos psiquiátricos, assim como o número de transtornos presentes, geralmente está associada com um risco aumentado para iniciar o uso de nicotina ou outras substâncias, assim como um maior risco de transição de abuso para dependência (Swendsen et al., 2010). Dessa forma, como o TDAH é um transtorno com início na infância é provável que o diagnóstico do transtorno proporcione um maior risco para o desenvolvimento do tabagismo, transtorno que ocorre mais tarde, durante adolescência ou idade adulta. Entretanto, observa-se que na amostra de pacientes com TDAH usada no presente estudo, a grande maioria dos pacientes não havia sido diagnosticada com TDAH durante a infância, apesar da existência dos sintomas. Em

muitos casos, o aparecimento de comorbidades, como depressão, ansiedade e uso de substâncias, entre outras, evidenciam os sintomas do TDAH e ocasionam prejuízos mais graves aos pacientes o que os leva a procurar por um diagnóstico. As comorbidades podem contribuir para uma maior probabilidade de diagnóstico para o TDAH. No entanto, os sintomas do TDAH e outros transtornos associados podem muitas vezes causar confusão e atrapalhar o diagnóstico. O tabagismo ao contrário de melhorar a cognição dos indivíduos, pode acentuar os seus déficits cognitivos, o que faz com que procurem por um diagnóstico. A depressão pode ter sintomas como desatenção, distração e irritabilidade, podendo simular o fenótipo de TDAH. Por outro lado, TDAH pode estar acompanhado por um transtorno depressivo ou resultar em um humor depressivo devido as constantes dificuldades na vida acadêmica, profissional e pessoal (Taurines et al., 2010). O TDAH em adultos, como o observado na nossa amostra, talvez não tenha exatamente a mesma base biológica do TDAH diagnosticado ainda na infância. As diferentes proporções observadas de acordo com o gênero na infância e idade adulta podem refletir a presença de comorbidades. Na infância a proporção de meninos e meninas é de 3:1, enquanto que na idade adulta a proporção de homens e mulheres é de 1:1 (Wilens and Dodson, 2004). O aparecimento de comorbidades como ansiedade e depressão, principalmente em mulheres, pode aumentar a busca por um diagnóstico nesse grupo. O tratamento de transtornos psiquiátricos pode prevenir o abuso e dependência de nicotina em aproximadamente 40% dos casos (Swendsen et al., 2010).

Apesar da tentativa de melhor compreensão do papel dos nAChRs na suscetibilidade ao tabagismo, qual o papel do TDAH e como esses receptores podem contribuir no desempenho cognitivo, é complicado saber como ocorre o funcionamento dos nAChRs, sendo que a nicotina é capaz de se ligar e ativar os diferentes tipos de nAChRs por todo o cérebro. Muito já se sabe sobre as combinações mais frequentes e áreas onde esses subtipos podem ser encontrados, no entanto, será que o cérebro de pacientes com TDAH e indivíduos da população geral apresentam os subtipos de nAChRs nas mesmas proporções e regiões cerebrais? Receptores como os nicotínicos, no qual são necessárias cinco subunidades para a formação de um receptor funcional, são complexos e permitem muitas hipóteses. Além disso, as alterações na expressão gênica causadas pelo uso de nicotina podem influenciar diversos processos desencadeados pela nicotina, incluindo a

ativação de vias fisiológicas, a alteração no desenvolvimento, a neurotoxicidade, a tolerância e a dependência de nicotina (Polesskaya et al., 2007).

Os efeitos dos genes CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 e suas interações com outros sistemas como o DAérgico, o serotoninérgico, o GABAérgico ainda precisam ser investigados, visto que a ativação dos nAChRs influencia a liberação desses neurotransmissores em diferentes áreas cerebrais. O gene do receptor D2 de dopamina (DRD2), assim como o complexo gênico CHRNA6-CHRNA3, podem ser essencialmente relevante para testar interação com estes genes na suscetibilidade ao tabagismo em pacientes com TDAH, visto que polimorfismos nesses genes também mostraram ser modulados por sintomas do TDAH no risco de tabagismo (McClernon et al., 2008; Bidwell et al., 2012; Lee et al., 2013). Estudos utilizando modelos animais podem contribuir para uma melhor compreensão da interação desses sistemas. Além disso, outros estudos investigando o papel do complexo gênico e outros genes de nAChRs na suscetibilidade ao tabagismo em pacientes com transtornos psiquiátricos são importantes, podendo contribuir com estratégias de prevenção e de possíveis tratamentos para o tabagismo.

Desta forma, o tratamento de transtornos com início na infância, como o TDAH, talvez pudesse prevenir determinados casos de tabagismo na adolescência e idade adulta. Será que o uso de nicotina em alguns indivíduos que fazem parte da amostra poderia ser diminuído ou ter um curso diferente caso eles tivessem sido diagnosticados e tratados para o TDAH na infância? Adultos não diagnosticados na infância apresentariam um maior risco para o tabagismo? Ou o próprio tabagismo aumentaria a probabilidade de busca por tratamento para o TDAH? Todas essas questões se mostram cada vez mais em aberto. Embora a presente tese não tenha as respostas, até porque o desenho não é longitudinal, as associações demonstradas sugerem a importância do estudo dos genes em receptores nicotínicos como elementos relevantes nas relações entre o uso de nicotina, TDAH e cognição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrantes AM, Strong DR, Ramsey SE, Lewinsohn PM and Brown RA (2005) Substance use disorder characteristics and externalizing problems among inpatient adolescent smokers. *J Psychoactive Drugs* 37:391-399.
- Adler LA (2008) Epidemiology, impairments, and differential diagnosis in adult ADHD: introduction. *CNS Spectr* 13:4-5.
- Advokat C (2010) What are the cognitive effects of stimulant medications? Emphasis on adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Biobehav Rev* 34:1256-1266.
- Advokat C and Scheithauer M (2013) Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) stimulant medications as cognitive enhancers. *Front Neurosci* 7:82.
- Akutagava-Martins GC, Salatino-Oliveira A, Kieling CC, Rohde LA and Hutz MH (2013) Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: current findings and future directions. *Expert Rev Neurother* 13:435-445.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M and Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. American Psychiatric Association, Washington.
- Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, Dong Q, Zhang Q, Gu X, Vijaykrishnan J, et al. (2008) Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40:616-622.
- Aubin HJ, Rollema H, Svensson TH and Winterer G (2012) Smoking, quitting, and psychiatric disease: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 36:271-284.
- Bailey CD, De Biasi M, Fletcher PJ and Lambe EK (2010) The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J Neurosci* 30:9241-9252.

- Barik J and Wonnacott S (2009) Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb Exp Pharmacol*:173-207.
- Beaudreau SA and O'Hara R (2008) Late-life anxiety and cognitive impairment: a review. *Am J Geriatr Psychiatry* 16:790-803.
- Berggren U, Berglund K, Fahlke C, Aronsson E, Eriksson M and Balldin J (2007) Tobacco use is associated with more severe alcohol dependence, as assessed by the number of DSM-IV criteria, in Swedish male type 1 alcoholics. *Alcohol Alcohol* 42:247-251.
- Bidwell LC, Garrett ME, McClernon FJ, Fuemmeler BF, Williams RB, Ashley-Koch AE and Kollins SH (2012) A preliminary analysis of interactions between genotype, retrospective ADHD symptoms, and initial reactions to smoking in a sample of young adults. *Nicotine Tob Res* 14:229-233.
- Biederman J, Fried R, Petty C, Mahoney L and Faraone SV (2012) An examination of the impact of attention-deficit hyperactivity disorder on IQ: a large controlled family-based analysis. *Can J Psychiatry* 57:608-616.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Wilens TE, Fontanella JA, Poetzl KM, Kirk T, Masse J and Faraone SV (2006) Is cigarette smoking a gateway to alcohol and illicit drug use disorders? A study of youths with and without attention deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 59:258-264.
- Biederman J, Petty CR, Dolan C, Hughes S, Mick E, Monuteaux MC and Faraone SV (2008) The long-term longitudinal course of oppositional defiant disorder and conduct disorder in ADHD boys: findings from a controlled 10-year prospective longitudinal follow-up study. *Psychol Med* 38:1027-1036.
- Biederman J, Wilens TE, Mick E, Faraone SV and Spencer T (1998) Does attention-deficit hyperactivity disorder impact the developmental course of drug and alcohol abuse and dependence? *Biol Psychiatry* 44:269-273.

- Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, Swan GE, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, et al. (2007) Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 16:24-35.
- Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, et al. (2008) Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 165:1163-1171.
- Boden JM, Fergusson DM and Horwood LJ (2010) Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *Br J Psychiatry* 196:440-446.
- Breese CR, Marks MJ, Logel J, Adams CE, Sullivan B, Collins AC and Leonard S (1997) Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J Pharmacol Exp Ther* 282:7-13.
- Brennan KA, Lea RA, Fitzmaurice PS and Truman P (2010) Nicotinic receptors and stages of nicotine dependence. *J Psychopharmacol* 24:793-808.
- Bridgett DJ and Walker ME (2006) Intellectual functioning in adults with ADHD: a meta-analytic examination of full scale IQ differences between adults with and without ADHD. *Psychol Assess* 18:1-14.
- Broms U, Wedenoja J, Largeau MR, Korhonen T, Pitkaniemi J, Keskitalo-Vuokko K, Happola A, Heikkila KH, Heikkila K, Ripatti S, et al. (2012) Analysis of detailed phenotype profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res* 14:720-733.
- Burke JD, Loeber R, White HR, Stouthamer-Loeber M and Pardini DA (2007) Inattention as a key predictor of tobacco use in adolescence. *J Abnorm Psychol* 116:249-259.
- Button TM, Maughan B and McGuffin P (2007) The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev* 83:727-732.

- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J and Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26:321-352.
- Carmona S, Proal E, Hoekzema EA, Gispert JD, Picado M, Moreno I, Soliva JC, Bielsa A, Rovira M, Hilferty J, et al. (2009) Ventro-striatal reductions underpin symptoms of hyperactivity and impulsivity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 66:972-977.
- Castellanos FX and Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3:617-628.
- Chen LS, Xian H, Gruzca RA, Saccone NL, Wang JC, Johnson EO, Breslau N, Hatsukami D and Bierut LJ (2012) Nicotine dependence and comorbid psychiatric disorders: examination of specific genetic variants in the CHRNA5-A3-B4 nicotinic receptor genes. *Drug Alcohol Depend* 123 Suppl 1:S42-51.
- Chen X, Chen J, Williamson VS, An SS, Hetta JM, Aggen SH, Neale MC and Kendler KS (2009) Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B:926-933.
- Christakis NA and Fowler JH (2008) The collective dynamics of smoking in a large social network. *N Engl J Med* 358:2249-2258.
- Clatworthy PL, Lewis SJ, Brichard L, Hong YT, Izquierdo D, Clark L, Cools R, Aigbirhio FI, Baron JC, Fryer TD, et al. (2009) Dopamine release in dissociable striatal subregions predicts the different effects of oral methylphenidate on reversal learning and spatial working memory. *J Neurosci* 29:4690-4696.
- Cloninger CR, Svrakic DM and Przybeck TR (1993) A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50:975-990.
- Cools R, Aarts E and Mehta MA (2011) Paradoxical effects of drugs on cognitive function: the neuropsychopharmacology of the dopamine and other neurotransmitter systems.

In: Kapur N (ed) *The Paradoxical Brain*. 1st edition. Cambridge University Press, New York, pp 397-417.

Counotte DS, Spijker S, Van de Burgwal LH, Hogenboom F, Schoffelmeer AN, De Vries TJ, Smit AB and Pattij T (2009) Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats. *Neuropsychopharmacology* 34:299-306.

Cummings KM, Fong GT and Borland R (2009) Environmental influences on tobacco use: evidence from societal and community influences on tobacco use and dependence. *Annu Rev Clin Psychol* 5:433-458.

Dani JA and Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16:905-908.

David SP, Hamidovic A, Chen GK, Bergen AW, Wessel J, Kasberger JL, Brown WM, Petruzella S, Thacker EL, Kim Y, et al. (2012) Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in African Americans. *Transl Psychiatry* 2:e119.

Day M, Pan JB, Buckley MJ, Cronin E, Hollingsworth PR, Hirst WD, Navarra R, Sullivan JP, Decker MW and Fox GB (2007) Differential effects of ciproxifan and nicotine on impulsivity and attention measures in the 5-choice serial reaction time test. *Biochem Pharmacol* 73:1123-1134.

de Viron S, Malats N, Van der Heyden J, Van Oyen H and Brand A (2013) Environmental and genomic factors as well as interventions influencing smoking cessation: a systematic review of reviews and a proposed working model. *Public Health Genomics* 16:159-173.

Del'guidice T, Lemasson M, Etievant A, Manta S, Magno LA, Escoffier G, Roman FS and Beaulieu JM (2013) Dissociations between cognitive and motor effects of psychostimulants and atomoxetine in hyperactive DAT-KO mice. *Psychopharmacology (Berl)*.

Del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ and Robbins TW (2011) The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 69:e145-157.

- Dichter GS, Damiano CA and Allen JA (2012) Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *J Neurodev Disord* 4:19.
- Dierker LC, Canino G and Merikangas KR (2006) Association between parental and individual psychiatric/substance use disorders and smoking stages among Puerto Rican adolescents. *Drug Alcohol Depend* 84:144-153.
- DiFranza JR, Huang W and King J (2012) Neuroadaptation in nicotine addiction: Update on the sensitization-homeostasis model. *Brain Sci* 2: 523-552.
- Dinn WM, Aycicegi A and Harris CL (2004) Cigarette smoking in a student sample: neurocognitive and clinical correlates. *Addict Behav* 29:107-126.
- Downey KK, Pomerleau CS and Pomerleau OF (1996) Personality differences related to smoking and adult attention deficit hyperactivity disorder. *J Subst Abuse* 8:129-135.
- Duga S, Solda G, Asselta R, Bonati MT, Dalpra L, Malcovati M and Tenchini ML (2001) Characterization of the genomic structure of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster and identification of novel intragenic polymorphisms. *J Hum Genet* 46:640-648.
- Dwyer JB, McQuown SC and Leslie FM (2009) The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* 122:125-139.
- Ehringer MA, Clegg HV, Collins AC, Corley RP, Crowley T, Hewitt JK, Hopfer CJ, Krauter K, Lessem J, Rhee SH, et al. (2007) Association of the neuronal nicotinic receptor beta2 subunit gene (CHRNA2) with subjective responses to alcohol and nicotine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:596-604.
- Etter JF, Pelissolo A, Pomerleau C and De Saint-Hilaire Z (2003) Associations between smoking and heritable temperament traits. *Nicotine Tob Res* 5:401-409.
- Faraone SV and Mick E (2010) Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33:159-180.

- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA and Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313-1323.
- Feng Y, Niu T, Xing H, Xu X, Chen C, Peng S, Wang L and Laird N (2004) A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *Am J Hum Genet* 75:112-121.
- Flensburg-Madsen T, von Scholten MB, Flachs EM, Mortensen EL, Prescott E and Tolstrup JS (2011) Tobacco smoking as a risk factor for depression. A 26-year population-based follow-up study. *J Psychiatr Res* 45:143-149.
- Flora A, Schulz R, Benfante R, Battaglioli E, Terzano S, Clementi F and Fornasari D (2000) Neuronal and extraneuronal expression and regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene. *J Neurochem* 75:18-27.
- Flory K, Milich R, Lynam DR, Leukefeld C and Clayton R (2003) Relation between childhood disruptive behavior disorders and substance use and dependence symptoms in young adulthood: individuals with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder are uniquely at risk. *Psychol Addict Behav* 17:151-158.
- Fowler CD, Lu Q, Johnson PM, Marks MJ and Kenny PJ (2011) Habenular alpha5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 471:597-601.
- Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, Auer S, Filkin S, Pons S, Fontaine JF, Tsetlin V, et al. (2011) Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron* 70:522-535.
- Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S, Haavik J, et al. (2012) The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry* 17:960-987.
- Franke B, Neale BM and Faraone SV (2009) Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* 126:13-50.

- Freathy RM, Ring SM, Shields B, Galobardes B, Knight B, Weedon MN, Smith GD, Frayling TM and Hattersley AT (2009) A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) is associated with a reduced ability of women to quit smoking in pregnancy. *Hum Mol Genet* 18:2922-2927.
- Frishman WH, Mitta W, Kupersmith A and Ky T (2006) Nicotine and non-nicotine smoking cessation pharmacotherapies. *Cardiol Rev* 14:57-73.
- Fuemmeler BF, Kollins SH and McClernon FJ (2007) Attention deficit hyperactivity disorder symptoms predict nicotine dependence and progression to regular smoking from adolescence to young adulthood. *J Pediatr Psychol* 32:1203-1213.
- Furberg H, Kim Y, Dackor J, Boerwinkle E, Franceschini N, Ardissino D, Bernardinelli L, Mannucci PL, Mauri F and Merlini PA et al. (2010) Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 42: 441-447.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M and Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283:397-401.
- Genro JP, Kieling C, Rohde LA and Hutz MH (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother* 10:587-601.
- Giedd JN and Rapoport JL (2010) Structural MRI of pediatric brain development: what have we learned and where are we going? *Neuron* 67:728-734.
- Gizer IR, Ficks C and Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51-90.
- Glass K and Flory K (2010) Why does ADHD confer risk for cigarette smoking? A review of psychosocial mechanisms. *Clin Child Fam Psychol Rev* 13:291-313.
- Goforth HW, Murtaugh R and Fernandez F (2010) Neurologic aspects of drug abuse. *Neurol Clin* 28:199-215.

- Gotti C and Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L and Zoli M (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 78:703-711.
- Gotti C, Zoli M and Clementi F (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27:482-491.
- Gould TJ (2010) Addiction and cognition. *Addict Sci Clin Pract* 5:4-14.
- Gould TJ and Leach PT (2013) Cellular, molecular, and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning. *Neurobiol Learn Mem.*
- Gray KM, Baker NL, Carpenter MJ, Lewis AL and Upadhyaya HP (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder confounds nicotine withdrawal self-report in adolescent smokers. *Am J Addict* 19:325-331.
- Greenbaum L, Kanyas K, Karni O, Merbl Y, Olender T, Horowitz A, Yakir A, Lancet D, Ben-Asher E and Lerer B (2006) Why do young women smoke? I. Direct and interactive effects of environment, psychological characteristics and nicotinic cholinergic receptor genes. *Mol Psychiatry* 11:312-322, 223.
- Greenbaum L, Rigbi A, Lipshtat N, Cilia R, Tesei S, Asselta R, Djaldetti R, Goldwurm S and Lerer B (2013) Association of nicotine dependence susceptibility gene, *CHRNA5*, with Parkinson's disease age at onset: gene and smoking status interaction. *Parkinsonism Relat Disord* 19:72-76.
- Gruza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, Bucholz KK, Cloninger CR, Neuman RJ, Budde JP, et al. (2008) A risk allele for nicotine dependence in *CHRNA5* is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 64:922-929.

- Haavik J, Halmoy A, Lundervold AJ and Fasmer OB (2010) Clinical assessment and diagnosis of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother* 10:1569-1580.
- Hamilton AS, Lessov-Schlaggar CN, Cockburn MG, Unger JB, Cozen W and Mack TM (2006) Gender differences in determinants of smoking initiation and persistence in California twins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1189-1197.
- Hancock DB, Artigas MS, Gharib SA, Henry A, Manichaikul A, Ramasamy A, Loth DW, Imboden M, Koch B, McArdle WL, et al. (2012) Genome-wide joint meta-analysis of SNP and SNP-by-smoking interaction identifies novel loci for pulmonary function. *PLoS Genet* 8:e1003098.
- Hayatbakhsh R, Mamun AA, Williams GM, O'Callaghan MJ and Najman JM (2013) Early childhood predictors of early onset of smoking: a birth prospective study. *Addict Behav* 38:2513-2519.
- Heath CJ, King SL, Gotti C, Marks MJ and Picciotto MR (2010) Cortico-thalamic connectivity is vulnerable to nicotine exposure during early postnatal development through $\alpha 4/\beta 2/\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacology* 35:2324-2338.
- Heath CJ and Picciotto MR (2009) Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1:254-262.
- Heishman SJ, Kleykamp BA and Singleton EG (2010) Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacology (Berl)* 210:453-469.
- Heldt SA and Ressler KJ (2006) Lesions of the habenula produce stress- and dopamine-dependent alterations in prepulse inhibition and locomotion. *Brain Res* 1073-1074:229-239.

- Henningfield JE, Miyasato K and Jasinski DR (1985) Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 234:1-12.
- Henningfield JE, Shiffman S, Ferguson SG and Gritz ER (2009) Tobacco dependence and withdrawal: science base, challenges and opportunities for pharmacotherapy. *Pharmacol Ther* 123:1-16.
- Herman AI and Sofuoglu M (2010) Cognitive effects of nicotine: genetic moderators. *Addict Biol* 15:250-265.
- Herman L, Shtayermman O, Aksnes B, Anzalone M, Cormerais A and Liodice C (2011) The use of prescription stimulants to enhance academic performance among college students in health care programs. *J Physician Assist Educ* 22:15-22.
- Hervey AS, Epstein JN and Curry JF (2004) Neuropsychology of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neuropsychology* 18:485-503.
- Hindorff LA, MacArthur J, Morales J, Junkins HA, Hall PN, Klemm AK and Manolio TA. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available at: www.genome.gov/gwastudies. Accessed 09 May 2013.
- Hogg RC and Bertrand D (2004) Nicotinic acetylcholine receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:123-130.
- Hong LE, Yang X, Wonodi I, Hodgkinson CA, Goldman D, Stine OC, Stein ES and Thaker GK (2011) A CHRNA5 allele related to nicotine addiction and schizophrenia. *Genes Brain Behav* 10:530-535.
- Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, et al. (2008) A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452:633-637.

- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2011) A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 76 pp.
- Jackson KJ, Fanous AH, Chen J, Kendler KS and Chen X (2013) Variants in the 15q25 gene cluster are associated with risk for schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatr Genet* 23:20-28.
- Jamal M, Willem Van der Does AJ, Cuijpers P and Penninx BW (2012) Association of smoking and nicotine dependence with severity and course of symptoms in patients with depressive or anxiety disorder. *Drug Alcohol Depend* 126:138-146.
- Jasinska AJ, Zorick T, Brody AL and Stein EA (2013) Dual role of nicotine in addiction and cognition: A review of neuroimaging studies in humans. *Neuropharmacology*.
- Kalivas PW and Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162:1403-1413.
- Kalyva E (2007) Prevalence and influences on self-reported smoking among adolescents with mild learning disabilities, attention deficit hyperactivity disorder, and their typically developing peers. *J Intellect Disabil* 11:267-279.
- Kapoor M, Wang JC, Bertelsen S, Bucholz K, Budde JP, Hinrichs A, Agrawal A, Brooks A, Chorlian D, Dick D, et al. (2012) Variants located upstream of CHRNA4 on chromosome 15q25.1 are associated with age at onset of daily smoking and habitual smoking. *PLoS One* 7:e33513.
- Kieling C, Goncalves RR, Tannock R and Castellanos FX (2008) Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17:285-307, viii.
- Kieling R and Rohde LA (2012) ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. *Curr Top Behav Neurosci* 9:1-16.

- Kobayashi Y, Sano Y, Vannoni E, Goto H, Suzuki H, Oba A, Kawasaki H, Kanba S, Lipp HP, Murphy NP, et al. (2013) Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Front Behav Neurosci* 7:17.
- Kollins SH, McClernon FJ and Fuemmeler BF (2005) Association between smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in a population-based sample of young adults. *Arch Gen Psychiatry* 62:1142-1147.
- Lakhan SE and Kirchgessner A (2012) Prescription stimulants in individuals with and without attention deficit hyperactivity disorder: misuse, cognitive impact, and adverse effects. *Brain Behav* 2:661-677.
- Lambert N (2005) The contribution of childhood ADHD, conduct problems, and stimulant treatment to adolescent and adult tobacco and psychoactive substance abuse. *Ethical Human Psychology & Psychiatry* 7: 197–221.
- Lambek R, Tannock R, Dalsgaard S, Trillingsgaard A, Damm D and Thomsen PH (2011) Executive dysfunction in school-age children with ADHD. *J Atten Disord* 15:646-655.
- Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, Mirabello L, Jacobs K, Wheeler W, Yeager M, et al. (2009) A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 85:679-691.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J, et al. (2008) Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1345-1354.
- Le Marchand L, Derby KS, Murphy SE, Hecht SS, Hatsukami D, Carmella SG, Tiirikainen M and Wang H (2008) Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are exposed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Res* 68:9137-9140.

- Leach PT, Cordero KA and Gould TJ (2013) The effects of acute nicotine, chronic nicotine, and withdrawal from chronic nicotine on performance of a cued appetitive response. *Behav Neurosci* 127:303-310.
- Lecourtier L and Kelly PH (2007) A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31:658-672.
- Lee CT, Fuemmeler BF, McClernon FJ, Ashley-Koch A and Kollins SH (2013) Nicotinic receptor gene variants interact with attention deficient hyperactive disorder symptoms to predict smoking trajectories from early adolescence to adulthood. *Addict Behav* 38:2683-2689.
- Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R and Glass K (2011) Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 31:328-341.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C, Nguyen TT, Craig DW, Romanos J, Heine M, Meyer J, et al. (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* 115:1573-1585.
- Li MD (2003) The genetics of smoking related behavior: a brief review. *Am J Med Sci* 326:168-173.
- Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA and Martin ER (2007) No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet* 80:531-538.
- Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodriguez A, Kotimaa A, Moilanen I, Thomsen PH, Olsen J, et al. (2003) Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry* 160:1028-1040.
- Lising-Enriquez K and George TP (2009) Treatment of comorbid tobacco use in people with serious mental illness. *J Psychiatry Neurosci* 34:E1-2.

- Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, Berrettini W, Knouff CW, Yuan X, Waeber G, et al. (2010) Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 42:436-440.
- Liu Z, Neff RA and Berg DK (2006) Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development. *Science* 314:1610-1613.
- Maggi L, Le Magueresse C, Changeux JP and Cherubini E (2003) Nicotine activates immature "silent" connections in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2059-2064.
- Mahone EM, Crocetti D, Ranta ME, Gaddis A, Cataldo M, Slifer KJ, Denckla MB and Mostofsky SH (2011) A preliminary neuroimaging study of preschool children with ADHD. *Clin Neuropsychol* 25:1009-1028.
- Mansvelder HD and McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* 53:606-617.
- Marques-Vidal P, Kutalik Z, Paccaud F, Bergmann S, Waeber G, Vollenweider P and Cornuz J (2011) Variant within the promoter region of the *CHRNA3* gene associated with FTN dependence is not related to self-reported willingness to quit smoking. *Nicotine Tob Res* 13:833-839.
- Matthies S, Holzner S, Feige B, Scheel C, Perlov E, Ebert D, Tebartz van Elst L and Philipsen A (2013) ADHD as a serious risk factor for early smoking and nicotine dependence in adulthood. *J Atten Disord* 17:176-186.
- McClernon FJ, Fuemmeler BF, Kollins SH, Kail ME and Ashley-Koch AE (2008) Interactions between genotype and retrospective ADHD symptoms predict lifetime smoking risk in a sample of young adults. *Nicotine Tob Res* 10:117-127.
- McClernon FJ and Kollins SH (2008) ADHD and smoking: from genes to brain to behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1141:131-147.

- McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, et al. (2008) Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 40:1404-1406.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, Biederman J, Byrne D, Dechairo B, Guiney A, et al. (2010) Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:898-905 e893.
- Mihailescu S and Drucker-Colin R (2000) Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch Med Res* 31:131-144.
- Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Chen L and Jones J (1997) ADHD is associated with early initiation of cigarette smoking in children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:37-44.
- Miles JN and Weden MM (2012) Is the intergenerational transmission of smoking from mother to child mediated by children's behavior problems? *Nicotine Tob Res* 14:1012-1018.
- Millar NS and Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56:237-246.
- Miller NS and Cocores JA (1991) Nicotine dependence: diagnosis, pharmacology and treatment. *J Addict Dis* 11:51-65.
- Mineur YS and Picciotto MR (2008) Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* 75:323-333.
- Mitchell JT, McIntyre EM, McClernon FJ and Kollins SH (2013) Smoking Motivation in Adults With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Using the Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives. *Nicotine Tob Res*.
- Mojtabai R and Crum RM (2013) Cigarette smoking and onset of mood and anxiety disorders. *Am J Public Health* 103:1656-1665.

- Molina BS and Pelham WE, Jr. (2003) Childhood predictors of adolescent substance use in a longitudinal study of children with ADHD. *J Abnorm Psychol* 112:497-507.
- Morisano D, Bacher I, Audrain-McGovern J and George TP (2009) Mechanisms underlying the comorbidity of tobacco use in mental health and addictive disorders. *Can J Psychiatry* 54:356-367.
- Moylan S, Gustavson K, Karevold E, Overland S, Jacka FN, Pasco JA and Berk M (2013) The impact of smoking in adolescence on early adult anxiety symptoms and the relationship between infant vulnerability factors for anxiety and early adult anxiety symptoms: the TOPP Study. *PLoS One* 8:e63252.
- Muller KU, Mennigen E, Ripke S, Banaschewski T, Barker GJ, Buchel C, Conrod P, Fauth-Buhler M, Flor H, Garavan H, et al. (2013) Altered reward processing in adolescents with prenatal exposure to maternal cigarette smoking. *JAMA Psychiatry* 70:847-856.
- Munafo M, Clark T, Johnstone E, Murphy M and Walton R (2004) The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob Res* 6:583-597.
- Napolitano F, Bonito-Oliva A, Federici M, Carta M, Errico F, Magara S, Martella G, Nistico R, Centonze D, Pisani A, et al. (2010) Role of aberrant striatal dopamine D1 receptor/cAMP/protein kinase A/DARPP32 signaling in the paradoxical calming effect of amphetamine. *J Neurosci* 30:11043-11056.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Asherson P, Chen W, Banaschewski T, et al. (2008) Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1337-1344.
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P, et al. (2010) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:906-920.

- Nutt DJ, Fone K, Asherson P, Bramble D, Hill P, Matthews K, Morris KA, Santosh P, Sonuga-Barke E, Taylor E, et al. (2007) Evidence-based guidelines for management of attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescents in transition to adult services and in adults: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* 21:10-41.
- Ohlmeier MD, Peters K, Kordon A, Seifert J, Wildt BT, Wiese B, Ziegenbein M, Emrich HM and Schneider U (2007) Nicotine and alcohol dependence in patients with comorbid attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Alcohol Alcohol* 42:539-543.
- Organização Mundial da Saúde (2007) Neurociência do uso e da dependência de substâncias psicoativas. Roca, São Paulo, 240pp.
- Osler M, Holst C, Prescott E and Sorensen TI (2001) Influence of genes and family environment on adult smoking behavior assessed in an adoption study. *Genet Epidemiol* 21:193-200.
- Pagani LS (2013) Environmental tobacco smoke exposure and brain development: The case of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Pickworth WB, Fant RV, Nelson RA, Rohrer MS and Henningfield JE (1999) Pharmacodynamic effects of new de-nicotinized cigarettes. *Nicotine Tob Res* 1:357-364.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J and Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942-948.
- Polesskaya OO, Fryxell KJ, Merchant AD, Locklear LL, Ker KF, McDonald CG, Eppolito AK, Smith LN, Wheeler TL and Smith RF (2007) Nicotine causes age-dependent changes in gene expression in the adolescent female rat brain. *Neurotoxicol Teratol* 29:126-140.

- Pomerleau OF, Downey KK, Stelson FW and Pomerleau CS (1995) Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. *J Subst Abuse* 7:373-378.
- Potter AS and Newhouse PA (2008) Acute nicotine improves cognitive deficits in young adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 88:407-417.
- Purper-Ouakil D, Ramoz N, Lepagnol-Bestel AM, Gorwood P and Simonneau M (2011) Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res* 69:69R-76R.
- Rana BK, Wessel J, Mahboubi V, Rao F, Haeller J, Gayen JR, Eskin E, Valle AM, Das M, Mahata SK, et al. (2009) Natural variation within the neuronal nicotinic acetylcholine receptor cluster on human chromosome 15q24: influence on heritable autonomic traits in twin pairs. *J Pharmacol Exp Ther* 331:419-428.
- Rodriguez D, Tercyak KP and Audrain-McGovern J (2008) Effects of inattention and hyperactivity/impulsivity symptoms on development of nicotine dependence from mid adolescence to young adulthood. *J Pediatr Psychol* 33:563-575.
- Rohde P, Kahler CW, Lewinsohn PM and Brown RA (2004) Psychiatric disorders, familial factors, and cigarette smoking: II. Associations with progression to daily smoking. *Nicotine Tob Res* 6:119-132.
- Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, Agrawal A, Breslau N, Grucza RA, Hatsukami D, et al. (2009a) Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B:453-466.
- Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, Grucza RA, Sun L, Duan W, Budde J, et al. (2009b) The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res* 69:6848-6856.

- Sarginson JE, Killen JD, Lazzeroni LC, Fortmann SP, Ryan HS, Schatzberg AF and Murphy GM, Jr. (2011) Markers in the 15q24 nicotinic receptor subunit gene cluster (CHRNA5-A3-B4) predict severity of nicotine addiction and response to smoking cessation therapy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B:275-284.
- Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M and Fujii Y (2010) CHRNA5 gene D398N polymorphism in Japanese lung adenocarcinoma. *J Surg Res* 162:75-78.
- Schlaepfer IR, Hoft NR, Collins AC, Corley RP, Hewitt JK, Hopfer CJ, Lessem JM, McQueen MB, Rhee SH, Ehringer MA (2008) The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry* 63:1039-1046.
- Schnoll RA, Johnson TA and Lerman C (2007) Genetics and smoking behavior. *Curr Psychiatry Rep* 9:349-357.
- Schoechlin C and Engel RR (2005) Neuropsychological performance in adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis of empirical data. *Arch Clin Neuropsychol* 20:727-744.
- Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, Anton RF, Oslin D, Farrer LA and Gelernter J (2010) Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 35:1921-1931.
- Silva KL, Guimaraes-da-Silva PO, Grevet EH, Victor MM, Salgado CA, Vitola ES, Mota NR, Fischer AG, Contini V, Picon FA, et al. (2013) Cognitive deficits in adults with ADHD go beyond comorbidity effects. *J Atten Disord* 17:483-488.
- Soler Artigas M, Loth DW, Wain LV, Gharib SA, Obeidat M, Tang W, Zhai G, Zhao JH, Smith AV, Huffman JE, et al. (2011) Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function. *Nat Genet* 43:1082-1090.

- Sousa NO, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Victor MM, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA, et al. (2011) Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res* 45:829-834.
- Steffens DC, Otey E, Alexopoulos GS, Butters MA, Cuthbert B, Ganguli M, Geda YE, Hendrie HC, Krishnan RR, Kumar A, et al. (2006) Perspectives on depression, mild cognitive impairment, and cognitive decline. *Arch Gen Psychiatry* 63:130-138.
- Stephens SH, Hoft NR, Schlaepfer IR, Young SE, Corley RC, McQueen MB, Hopfer C, Crowley T, Stallings M, Hewitt J, et al. (2012) Externalizing behaviors are associated with SNPs in the CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster. *Behav Genet* 42:402-414.
- 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 Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3517-3525.
- Swendsen J, Conway KP, Degenhardt L, Glantz M, Jin R, Merikangas KR, Sampson N and Kessler RC (2010) Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10-year follow-up of the National Comorbidity Survey. *Addiction* 105:1117-1128.
- Taurines R, Schmitt J, Renner T, Conner AC, Warnke A and Romanos M (2010) Developmental comorbidity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord* 2:267-289.
- Tercyak KP and Audrain-McGovern J (2003) Personality differences associated with smoking experimentation among adolescents with and without comorbid symptoms of ADHD. *Subst Use Misuse* 38:1953-1970.
- Tercyak KP, Lerman C and Audrain J (2002) Association of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms with levels of cigarette smoking in a community sample of adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:799-805.

- Thapar A, Cooper M, Jefferies R and Stergiakouli E (2012) What causes attention deficit hyperactivity disorder? *Arch Dis Child* 97:260-265.
- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, et al. (2008) A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452:638-642.
- Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Esko T, Walter S, et al. (2010) Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet* 42:448-453.
- Tripp G and Wickens JR (2008) Research review: dopamine transfer deficit: a neurobiological theory of altered reinforcement mechanisms in ADHD. *J Child Psychol Psychiatry* 49:691-704.
- Upadhyaya HP and Carpenter MJ (2008) Is attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptom severity associated with tobacco use? *Am J Addict* 17:195-198.
- van Emmerik-van Oortmerssen K, van de Glind G, van den Brink W, Smit F, Crunelle CL, Swets M and Schoevers RA (2012) Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorder in substance use disorder patients: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Drug Alcohol Depend* 122:11-19.
- Van Voorhees E, McClernon FJ, Fuemmeler B, English J, Holdaway A, Hallyburton M, Dew R and Kollins S (2012) An examination of differences in variables maintaining smoking behavior in adult smokers with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. *Addict Res Theory* 20: 72-81.
- Ventura ALM, Abreu PA, Freitas RCC, Sathler PC, Loureiro N and Castro HC (2010) Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Rev Psiq Clín* 37:66-72.
- VIGITEL (2011) Vigilância de fatores de risco e proteção de doenças crônicas por inquérito telefônico.

- Vink JM, Willemsen G and Boomsma DI (2005) Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Genet* 35:397-406.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS and Ding YS (2005) Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1410-1415.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS and Tomasi D (2012) Addiction circuitry in the human brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:321-336.
- Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Ma Y, et al. (2009) Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *JAMA* 302:1084-1091.
- Volkow ND, Wang GJ, Newcorn JH, Kollins SH, Wigal TL, Telang F, Fowler JS, Goldstein RZ, Klein N, Logan J, et al. (2011) Motivation deficit in ADHD is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. *Mol Psychiatry* 16:1147-1154.
- Wagner M, Schulze-Rauschenbach S, Petrovsky N, Brinkmeyer J, von der Goltz C, Grunder G, Spreckelmeyer KN, Wienker T, Diaz-Lacava A, Mobascher A, et al. (2013) Neurocognitive impairments in non-deprived smokers--results from a population-based multi-center study on smoking-related behavior. *Addict Biol* 18:752-761.
- Wang JC, Grucza R, Cruchaga C, Hinrichs AL, Bertelsen S, Budde JP, Fox L, Goldstein E, Reyes O, Saccone N, et al. (2009) Genetic variation in the *CHRNA5* gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 14:501-510.
- Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, et al. (2008) Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet* 40:1407-1409.

- Weiser M, Zarka S, Werbeloff N, Kravitz E and Lubin G (2010) Cognitive test scores in male adolescent cigarette smokers compared to non-smokers: a population-based study. *Addiction* 105:358-363.
- Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausern A, Dunn DM, Matsunami N, Singh NA, Baird L, Coon H, McMahon WM, et al. (2008) A candidate gene approach identifies the CHRNA5-A3-B4 region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction. *PLoS Genet* 4:e1000125.
- Whalen CK, Jamner LD, Henker B, Gehricke JG and King PS (2003) Is there a link between adolescent cigarette smoking and pharmacotherapy for ADHD? *Psychol Addict Behav* 17:332-335.
- Wilens TE, Adamson J, Sgambati S, Whitley J, Santry A, Monuteaux MC and Biederman J (2007) Do individuals with ADHD self-medicate with cigarettes and substances of abuse? Results from a controlled family study of ADHD. *Am J Addict* 16 Suppl 1:14-21; quiz 22-13.
- Wilens TE and Dodson W (2004) A clinical perspective of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood. *J Clin Psychiatry* 65:1301-1313.
- Wilens TE, Vitulano M, Upadhyaya H, Adamson J, Sawtelle R, Utzinger L and Biederman J (2008) Cigarette smoking associated with attention deficit hyperactivity disorder. *J Pediatr* 153:414-419.
- Winterer G, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Fehr C, Brenner H, Breitling LP, Nitz B, Raum E, Muller H, et al. (2010) Risk gene variants for nicotine dependence in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 cluster are associated with cognitive performance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:1448-1458.
- Wise RA (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51:13-22.
- Wolock SL, Yates A, Petrill SA, Bohland JW, Blair C, Li N, Machiraju R, Huang K and Bartlett CW (2013) Gene x smoking interactions on human brain gene expression:

finding common mechanisms in adolescents and adults. *J Child Psychol Psychiatry* 54:1109-1119.

World Health Organization (2011) WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco. WHO library cataloguing-in-publication data, pp 164

Wu J (2009) Understanding of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 30:653-655.

Young SE, Friedman NP, Miyake A, Willcutt EG, Corley RP, Haberstick BC and Hewitt JK (2009) Behavioral disinhibition: liability for externalizing spectrum disorders and its genetic and environmental relation to response inhibition across adolescence. *J Abnorm Psychol* 118:117-130.

Zhang H, Kranzler HR, Poling J and Gelernter J (2010) Variation in the nicotinic acetylcholine receptor gene cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* and its interaction with recent tobacco use influence cognitive flexibility. *Neuropsychopharmacology* 35:2211-2224.

Anexo 1 – Produção Científica Adicional no Período de Doutorado

de Azeredo LA, Rovaris DL, Mota NR, **Polina ER**, Marques FZ, Contini V, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Further evidence for the association between a polymorphism in the promoter region of SLC6A3/DAT1 and ADHD: findings from a sample of adults. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2014 Feb 1. [Epub ahead of print]

Rovaris DL, Mota NR, de Azeredo LA, Cupertino RB, Bertuzzi GP, **Polina ER**, Contini V, Kortmann GL, Vitola ES, Grevet EH, Grassi-Oliveira R, Callegari-Jacques SM, Bau CH (2013) MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *J Neural Transm* 120:1499-1505.

Guimarães-da-Silva PO, Silva KL, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Victor MM, Vitola ES, Mota NR, Fischer AG, Picon FA, Bertuzzi GP, **Polina ER**, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2012) Does age of onset of impairment impact on neuropsychological and personality features of adult ADHD? *J Psychiatr Res* 46:1307-1311.

Contini V, Bertuzzi GP, **Polina ER**, Hunemeier T, Hendler EM, Hutz MH, Bau CH (2012) A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 122:100-104.

Contini V, Victor MM, Cerqueira CC, **Polina ER**, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2011) Adrenergic α 2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261:205-211.

de Cerqueira CC, **Polina ER**, Contini V, Marques FZ, Grevet EH, Salgado CA, da Silva PO, Picon FA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2011) ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res* 186:345-350.