

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**O POLIMORFISMO T102C DO RECEPTOR SEROTONÉRGICO 5-HT<sub>2A</sub> PARTICIPA NA MANUTENÇÃO DO TABAGISMO E DOS MECANISMOS DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

PEDRO ANTÔNIO SCHMIDT DO PRADO LIMA  
Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALEXANDRE NETTO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre  
2004

# Agradecimentos

- Ao Carlos Alexandre Netto, pela orientação, conhecimento e experiência, além da irrestrita paciência e confiança, quase além do bom senso;
- À Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pelo excepcional acolhimento e por me introduzir no mundo da genética molecular;
- Ao André Palmimi, pelo acolhimento e parceria;
- Ao Jaderson Costa da Costa, pela liderança;
- Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUC, pelo carinho com que me receberam;
- Aos professores do Departamento de Bioquímica, pelo ensino;
- Ao Josué Bacaltchuk, pelo constante incentivo e motivação;
- A minha esposa, Melanie Ogliari Pereira, pela confiança, incentivo, carinho e ajuda na realização desta tese;
- Aos meus pais, Anna Aurora e Nabuco, pelo exemplo que sempre me inspirou.

# Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>Resumo</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	<b>10</b>
1.1 Neuroquímica do comportamento- O papel da serotonina	10
1.1.1 O polimorfismo T102C do receptor 5-HT <sub>2A</sub>	11
1.2 Tabagismo	13
1.2.1 A genética do tabagismo	13
1.2.2 Serotonina, tabagismo e neuroquímica da adição	14
<i>Nicotina e dopamina</i>	15
<i>A arquitetura e fisiologia do estriado</i>	17
<i>A dopamina no estriado promove a consolidação de novos comportamentos</i>	18
1.2.3 O receptor 5-HT <sub>2A</sub> e o tabagismo	19
1.2.4 Outras evidências ligando a serotonina ao tabagismo	21
1.3 O comportamento alimentar	22
1.3.1 A serotonina e o comportamento alimentar	23
<i>O efeito de agonistas serotoninérgicos no comportamento Alimentar</i>	25
<i>O efeito de antagonistas serotoninérgico no comportamento Alimentar</i>	26
<i>O efeito da infusão de serotonina no comportamento alimentar</i>	26
<i>Estudos associando polimorfismos genéticos de receptores de serotonina e transtornos do comportamento alimentar</i>	26
1.3.2 O receptor 5-HT <sub>2A</sub> e o comportamento alimentar	27
1.4 A genética molecular como ferramenta para estudos em neuroquímica	28
1.4.1 Esquema de protocolo de estudo relacionando comportamento alimentar e polimorfismo genético	29
<b>Capítulo 2 – Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo 3 – Metodologia</b>	<b>32</b>
3.1 Estudo sobre tabagismo	32
3.1.1 Amostra	32
3.1.2 Coleta de dados	33
3.1.3 Status em relação ao tabagismo	34
3.1.4 Análise molecular	34
3.1.5 Análise estatística - 34	

3.2 Estudo sobre comportamento alimentar	35
3.2.1 Amostra	35
3.2.2 Análise da dieta	36
3.2.3 Análise molecular	36
3.2.4 Análise estatística	37
<b>Capítulo 4 – Resultados</b>	<b>38</b>
Artigo: <i>Polimorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction</i>	40
Artigo: <i>Is serotonin important to our food preference?</i>	54
<b>Capítulo 5 – Discussão</b>	<b>69</b>
5.1 O receptor 5-HT <sub>2A</sub> e o tabagismo	69
5.2 O receptor 5-HT <sub>2A</sub> e a preferência alimentar	74
5.3 Integração	78
<b>Capítulo 6 – Conclusões</b>	<b>81</b>
<b>Capítulo 7 – Perspectivas</b>	<b>82</b>
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>83</b>
<b>Anexo</b>	<b>89</b>

## Lista de abreviaturas

A799C – Polimorfismo do gene da hidroxilase do triptofano em que na posição 799 pode estar ou uma adenina ou uma citosina

C – Citosina

C218A – Polimorfismo do gene da hidroxilase do triptofano em que na posição 218 pode estar ou uma citosina ou uma adenina

*m*-CPP – *m*-clorofenilpiperazina

DA – Dopamina

D<sub>2</sub> – Receptor de dopamina do tipo 2

DOI – (1-[2,5-dimetoxi-4-idofenil]-2-aminopropano)

-1438G/A – Polimorfismo do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> onde na posição 1438 da região promotora pode estar ou uma guanina ou uma adenina

MAO-B – Monoaminoxidase do tipo B

5-HT – Serotonina

5-HT<sub>1A</sub> – Receptor de serotonina do tipo 1A

5-HT<sub>2A</sub> – Receptor de serotonina do tipo 2A

T – Timina

T102C – Polimorfismo onde na posição 102 do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> onde pode estar ou uma timina ou uma citosina

## Resumo

A serotonina tem sido relacionada aos comportamentos apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autonômico. Os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe, projetam-se para todas as regiões do sistema nervoso central e atuam através de sete tipos de receptores diferentes (5-HT<sub>1-7</sub>). Os receptores do tipo 2 são categorizados em 3 sub-tipos (A, B e C). Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> são receptores pós sinápticos que promovem a ativação da fosfolipase C, responsável pela hidrólise de fosfolipídios da membrana neuronal, dando origem aos segundos mensageiros diacilglicerol e trifosfato de inositol.

O gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> apresenta alguns polimorfismos, entre os quais o T102C, onde na posição 102 pode estar ou uma timina (T) ou uma citosina (C). Este polimorfismo, apesar de não determinar uma alteração na seqüência de amionoácidos que compõem o receptor determina sua expressão em quantidade diferente.

Nesta tese, o polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi empregado como uma ferramenta para o estudo da neuroquímica do tabagismo e do comportamento alimentar.

No estudo acerca do tabagismo, um grupo de 625 sujeitos foi genotipado e classificado de acordo com seu comportamento em relação ao fumo (fumantes atuais, ex-fumantes ou não fumantes). Foram encontradas diferenças na distribuição dos genótipos quando fumantes atuais foram comparados com ex-fumantes e não fumantes, sugerindo que o polimorfismo T102C está associado com a manutenção, e não o início, do hábito de fumar. O genótipo CC era mais freqüente nos fumantes atuais do que nos ex-fumantes e não fumantes.

No estudo sobre o comportamento alimentar, um grupo de 240 sujeitos idosos foi genotipado e sua dieta espontânea foi avaliada tanto quanto ao conteúdo de macro quanto de micro-nutrientes. Foram encontradas diferenças na dieta relacionadas ao polimorfismo T102C. Os indivíduos TT comem uma maior quantidade e proporção de proteínas, apesar de não alterar a quantidade de calorias ingeridas. Eles ingerem mais carne vermelha todos os aminoácidos essenciais.

Concluindo, através de um instrumento da genética molecular que identifica sujeitos com suscetibilidade para terem uma menor ou maior quantidade de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, para o qual não há agonistas específicos, é possível sugerir o provável envolvimento deste receptor tanto nos mecanismos de manutenção da adição ao tabaco quanto nos de preferência alimentar.

# Abstract

Serotonin has been connected to a wide range of behaviors, like appetitive, emotional, motor, cognitive and autonomic. Serotonergic neurons are located in the raphe nucleus and projected to all regions of the central nervous system. There are seven types of serotonergic neurons (5-HT<sub>1-7</sub>). The receptors type 2 are further categorized in three subtypes (A, B and C). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor are postsynaptic and promote the activation of the phospholipase C, responsible for the phospholipids from the neural membrane hydrolyses, originating the second messengers' diacylglycerol and inositol triphosphate.

The 5-HT<sub>2A</sub> gene receptor show some polymorphisms, beyond them the T102C, that despite of maintaining the correct sequence of amino acids determine a differential expression of this gene.

In this work, the T102C polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> gene receptor, is employed like a tool for the study of tobacco addiction and food preference.

In the tobacco study, a sample of 625 subjects was genotyped and classified according to their smoking behavior (never, former or current smokers). We found differences in the distribution of the genotypes when the current smokers were compared with the never+former smokers, suggesting that T102C is associated with maintenance, but not with initiation of the smoking habit. The CC genotype was more frequent in the current smokers than in the never+former smokers.

In the food preference study, a sample of 240 old subjects was genotyped and the spontaneous diet was evaluated about the macro and micronutrients amount. We found differences in the food preference related with the distribution of the T102C polymorphism. TT individuals have eaten higher amount and proportion of proteins in their diet, in despite

of maintaining the same caloric intake. They ate more beef and all the essentials amino acids.

Concluding, with the use of a toll from the molecular genetics that identifies subjects with susceptibility to show a major, or minor amount of 5-HT<sub>2A</sub> receptors, to which there is no specific agonists, it was possible to suggest a possible contribution of this receptor in the tobacco addiction and in the mechanisms that govern human food preference.

# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1 Neuroquímica do comportamento – O papel da serotonina

A serotonina (5-HT) tem sido relacionada a praticamente todo o tipo de comportamento, como o apetitivo, emocional, motor, cognitivo e autonômico, além de vários transtornos psiquiátricos (depressão, ansiedades, obsessivo-compulsivo, esquizofrenia e impulsividade entre outros). Entretanto do ponto de vista fisiológico, não está claro se a serotonina afeta cada um destes comportamentos diretamente e especificamente ou se os influencia de forma indireta, coordenando como um todo a atividade do sistema nervoso, como se fosse responsável pelo ajuste fino desta atividade, em conjunto com o nível de ativação do sistema nervoso central (Frazer *et al*, 1999).

Um argumento a favor do papel regulador da 5-HT como um todo está na anatomia do sistema serotoninérgico, onde os corpos celulares destes neurônios estão posicionados no tronco cerebral (nos núcleos da rafe) e emitem projeções para todas as regiões do sistema nervoso (Aghajanian e Sanders-Bush, 2002). Outro argumento é o tipo de atividade destes neurônios, que apresentam um padrão repetitivo, característico das áreas geradoras de estímulos, em contraponto às puramente moduladoras (Frazer *et al*, 1999). Além disto, estes neurônios se tornam mais ativos em situações de maior ativação do sistema nervoso central, sobretudo quando uma resposta está sendo emitida (Cooper *et al*, 1996). Nesta última situação, a 5-HT tem a função de facilitar a resposta motora diminuindo o acesso a informações do sensorio que são irrelevantes para a resposta que está sendo emitida (Frazer *et al*, 1999).

Resumindo, a 5-HT provavelmente tem uma função reguladora do processo de resposta que envolve o sistema nervoso central. Desta forma, é onipresente, tendo um papel modulador, em todos os momentos do comportamento.

Nesta tese, foram desenvolvidos dois experimentos que visaram identificar a influência de um tipo de receptor de serotonina (5-HT<sub>2A</sub>) em dois diferentes comportamentos “apetitivos”: o tabagismo e a preferência alimentar.

Atualmente os receptores serotoninérgicos são divididos em sete grupos (5-HT<sub>1-7</sub>). Os receptores do tipo 2 são categorizados em três diferentes subtipos (A, B e C).

Os receptores do tipo 5-HT<sub>2A</sub> têm localização pós sináptica. Eles promovem a ativação da fosfolipase C específica para fosfoinositídeo, que é responsável pela hidrólise de fosfolipídios da membrana neuronal cuja cadeia lateral contenha inositol (fosfoinositídeo), dando origem aos segundos mensageiros diacilglicerol e inositol trifosfato. A ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> também media a despolarização neural através do fechamento de canais de K (Frazer *et al*, 1999).

### **1.1.1 O polimorfismo T102C do receptor 5-HT<sub>2A</sub>**

O gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> está localizado no cromossomo 13 (13q14-21) e foi pela primeira vez clonado em 1991 (Petroutko, 1998). Algumas variações polimórficas deste gene foram identificadas. A mais estudada entre elas está localizada na posição nucleotídica 102. Nela, pode estar posicionada uma timina (T) ou uma citosina (C), desta forma este polimorfismo é denominado T102C.

A troca de um nucleotídeo pode ocasionar a codificação de um diferente aminoácido, e neste caso há uma alteração na estrutura do receptor. Entretanto não é o que ocorre no

polimorfismo T102C do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, onde as seqüências TCT ou TCC codificam ambas a serina. Por este motivo ele é denominado silencioso, a seqüência de aminoácidos do receptor não é modificada. Entretanto ele é um polimorfismo funcional, já que os alelos T ou C determinam uma diferente expressão gênica, como foi elegantemente demonstrado por Polesskaya e Sokolov (2002). Estes autores desenvolveram um método para determinar o efeito dos alelos T ou C na expressão genética. A partir de tecido cerebral (córtex temporal) obtido após a morte de indivíduos heterozigóticos (TC), eles determinaram a quantidade de moléculas mRNA do receptor 5-HT<sub>2A</sub> transcritas do alelo T (adenosina) ou do alelo C (guanina). Este método tem o mérito de não envolver a comparação de diferentes indivíduos e de diferentes amostras de tecido, tornando possível evitar estes dois poderosos vieses. Eles demonstraram que a ocorrência do alelo C, em comparação ao alelo T, determina uma diminuição em aproximadamente 20% na expressão gênica, e como conseqüência, a quantidade de receptores. Desta forma, apesar de ser um polimorfismo silencioso, o T102C é funcional, e pode ser uma ferramenta útil no estudo do papel do receptor 5-HT<sub>2A</sub> em diferentes processos.

Do ponto de vista evolutivo, sabe-se que o alelo C é o selvagem e o alelo T é a mutação que ocorre na espécie humana. A partir da constatação de que a freqüência dos alelos é equilibrada na espécie humana em qualquer etnia estudada, deduz-se que esta é uma mutação que ocorreu precocemente na evolução (Petroutko, 1998). O equilíbrio na freqüência entre os dois alelos, variando de 45% a 55% (independente da etnia), facilita o emprego deste polimorfismo em pesquisas uma vez que diminui o número necessário de sujeitos a serem estudados.

## **1.2 Tabagismo**

O fumo é um grande problema de saúde pública em função de três fatores: O fumo é fator de risco para um grande número de doenças, uma grande porcentagem da população está exposta (em torno de 25%) e o abandono do tabaco é difícil uma vez que seu uso propicia o desenvolvimento de dependência à nicotina. Desta forma, a prevenção e o tratamento do tabagismo é um fator de promoção de saúde pública de alto impacto (Jones e Benowitz, 2002).

### **1.2.1 A genética do tabagismo**

O comportamento tabagista é influenciado por fatores genéticos e muitas pesquisas têm demonstrado a importância destes fatores não só na iniciação ao fumo como no desenvolvimento da adição ao tabaco (Arinami *et al*, 2000).

Em um estudo de base populacional envolvendo 1898 pares de gêmeas (mulheres) monozigóticas e dizigóticas, Kendler *et al* (1999) demonstraram que os fatores genéticos são mais importantes do que os ambientais na iniciação ao fumo (78% versus 22%) e no desenvolvimento da dependência ao tabaco (73% versus 28%).

Em outro estudo, examinando 3356 pares de gêmeos (homens) monozigóticos e dizigóticos americanos veteranos do Vietnam, True *et al* (1999) demonstraram que a herança para a dependência à nicotina era de 60,3% nesta população. A crítica que pode ser feita a este estudo é que esta amostra não é representativa da população geral, uma vez que veteranos de guerra tendem a apresentar mais transtornos psiquiátricos, como transtorno de estresse pós-traumático, do que a população geral. Entretanto, este viés pode afetar somente

a estimativa do peso da herança genética, não comprometendo a conclusão de que o tabagismo está sobre influência genética.

Uma vez estabelecido que o tabagismo, ao menos parcialmente, tem uma herança genética, o passo seguinte é a identificação de genes candidatos a serem estudados. Para isto é necessária a compreensão da neuroquímica da adição.

### **1.2.2 Serotonina e tabagismo- a neuroquímica da adição**

O ponto central da adição é o uso compulsivo da droga, ou seja, a perda do controle sobre atos que aparentemente são voluntários, como a procura e a administração desta, apesar de todas as conseqüências negativas (Berke e Hyman, 2000). A adição tem um caráter crônico. Uma vez desenvolvida, mesmo após longos períodos de abstinência, o risco de recaída permanece alto (Berke e Hyman, 2000). As drogas de abuso ou induzem efeitos prazerosos ou diminuem o sofrimento, desta forma motivando o seu uso repetitivo (Nestler *et al*, 2001). Elas provocam ‘gratificação’ e ‘reforço’. Ou seja, elas provocam estímulos que são interpretados como intrinsecamente positivos e que aumentam a probabilidade de que comportamentos que sejam temporalmente relacionados sejam repetidos (Nestler *et al*, 2001).

São identificados dois efeitos provocados por drogas aditivas:

1. Adaptações neurais que são principalmente respostas homeostáticas à estimulação excessiva provocada pela droga, e que dá origem à síndrome de abstinência e ao fenômeno de tolerância (Berke e Hyman, 2000),

2. Plasticidade sináptica que permite a associação entre estímulos provocados pela droga e o aprendizado de comportamentos específicos. Este fenômeno está no cerne da gênese e manutenção da adição propriamente dita (Berke e Hyman, 2000).

Dois fatores que frequentemente são associados com o conceito de dependência, a tolerância e a abstinência, são fenômenos que não são exclusivos do uso de drogas capazes de provocar adição (Berke e Hyman, 2000). Quase todos os fármacos sedativos, como os antipsicóticos, perdem este efeito com o uso crônico (tolerância), assim como antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina provocam síndromes de retirada após interrupção abrupta (uma forma de abstinência). Nenhum destes fármacos é capaz de produzir adição.

Apesar das diferentes substâncias que provocam adição (por exemplo, nicotina e álcool) possuírem efeitos neuroquímicos (respectivamente a ativação de receptores nicotínicos e a abertura de canais neurais de cloro) e comportamentais imediatos (estimulação ou inibição do sistema nervoso central) muito diversos, elas têm em comum o fato de provocarem a adição. Desta forma, todas devem ser capazes de ativar o mesmo mecanismo neurobiológico que se traduz no comportamento aditivo.

### *Nicotina e dopamina*

A figura 1 apresenta esquematicamente o circuito relacionado ao desenvolvimento da adição, como será explicado no texto abaixo.

O neurotransmissor central no desenvolvimento da adição a qualquer substância que tenha este potencial é a dopamina. Portanto, este também é o caso da nicotina (Berke e Hyman, 2000 e Laviolette e van der Kooy, 2002).

Louis e Clarke (1998) demonstraram que o aumento do comportamento locomotor em ratos induzido pela nicotina depende do sistema dopaminérgico mesolímbico estar intacto. A destruição deste, através da injeção na área ventral tegmental bilateralmente da neurotoxina 6-hidroxidopamina (destrói neurônios dopaminérgicos), impede a ação locomotora induzida pela nicotina.

A nicotina apresenta uma grande afinidade por receptores colinérgicos do tipo que contém subunidades  $\beta_2$ , que são altamente expressos na área ventral tegmental. Estes receptores mediam a liberação de dopamina, promovendo o reforço e a indução da ativação locomotora induzida pela nicotina (Picciotto, 1998).

Em modelos animais, a auto-administração sistêmica de nicotina é prejudicada quando antagonistas de receptores de nicotina são administrados diretamente na área ventral tegmental. A administração no núcleo accumbens é ineficaz (Kopnisky, Hyman, 2002).

Ou seja, a ação da nicotina sobre a estrutura reconhecidamente central no desenvolvimento da adição, o núcleo accumbens, pode se dar através da liberação de dopamina por neurônios localizados na área ventral tegmental e que se projetam através do circuito mesolímbico até este núcleo.

Apesar dos diversos efeitos das muitas drogas que provocam adição serem mediadas por múltiplos neurotransmissores em diversas regiões cerebrais, a maioria das drogas, entre as quais a nicotina e os psicoestimulantes, têm em comum a liberação de dopamina no estriato (Di Chiara, 1998). O bloqueio da dopamina nesta região atenua os efeitos da gratificação provocada por drogas capazes de produzir adição em testes animais (Wise, 1996).

Entretanto, a ativação exclusiva deste circuito não leva ao desenvolvimento da adição; outros fatores são necessários.

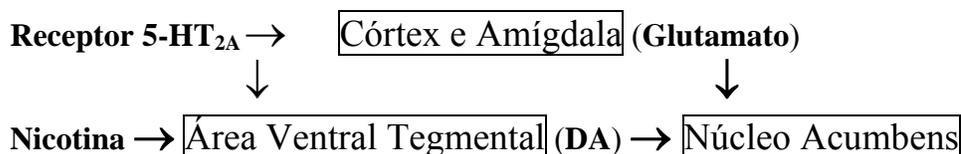


Figura 1. Representação esquemática do circuito envolvido no desenvolvimento de adição ao tabagismo. A nicotina ativa neurônios dopaminérgicos da área ventral tegmental que se projetam para o núcleo acumbens. Este sinal é modulado nos neurônios espinhosos por fibras glutamatérgicas oriundas do córtex cerebral e da amígdala. Receptores 5-HT<sub>2A</sub> modulam tanto a atividade dos neurônios dopaminérgicos da área ventral tegmental quanto os glutamatérgicos.

#### *A arquitetura e fisiologia do estriado (incluindo o núcleo accumbens)*

O sistema pálido-estriatal ventral assim como a “amígdala expandida” estão altamente envolvidos com funções emocionais e motivacionais (Heimer, 2003). Entre 90% a 95% dos neurônios do estriado, incluindo o núcleo accumbens, são neurônios gabaérgicos médios, com dendritos que possuem um grande número de “espinhos”. Estes espinhos recebem conexões sinápticas glutamatérgicas, de neurônios que se projetam de todas as áreas corticais e da amígdala. Cada célula espinhosa recebe conexões de milhares de aferentes glutamatérgicos, ou seja, estas células integram informações de diferentes locais (Berke, Hyman, 2000).

Os neurônios espinhosos são silenciosos a maior parte do tempo. A atividade simultânea de muitos aferentes glutamatérgicas coloca estes neurônios em um “modo ativo”, no qual, a partir de então, pequenas mudanças nos impulsos aferentes podem desencadear potenciais de ação (Stern, 1998).

A atividade das células espinhosas é freqüentemente dependente do contexto (grupo de estímulos), ou seja, um neurônio estriatal pode disparar em função de um determinado

estímulo que faz parte de um contexto específico, mas não quando o mesmo estímulo fizer parte de outro contexto (Kimura, 1992).

A dopamina é liberada por um pequeno número de neurônios que se projetam amplamente no estriado. Este é tão densamente povoado de terminais dopaminérgicos, que ocorre estimulação de sítios não sinápticos (Gonon, 1997). Ou seja, a neurotransmissão dopaminérgica tem uma especificidade temporal (menos de 1 segundo), mas não representa um padrão de informação detalhada e sim um sinal “global” (Schultz, 1998).

Desta forma, a informação detalhada é fornecida por fibras glutamatérgicas corticais e a dopamina modula esta informação.

#### *A dopamina no estriado promove a consolidação de novos comportamentos*

A dopamina no estriado modula a “reatividade comportamental” do organismo. A diminuição desta, como ocorre na doença de Parkinson, promove a lentificação ou inibição do início das ações em geral (Blackburn, 1992 e Salamone, 1997).

Além do efeito imediato de facilitar a ação, a dopamina também regula o aprendizado em circuitos estriatais. Este aprendizado é caracterizado pela progressiva execução de uma ação em particular ou de uma seqüência comportamental, geralmente em resposta a um estímulo específico. Trata-se de uma forma de memória implícita. Ela inclui não somente a ação motora propriamente dita, mas também toda a seqüência de associações que levam ao comportamento apreendido. Esta aprendizagem comportamental uma vez estabelecida é difícil de ser extinta, persistindo mesmo quando as conseqüências são indesejáveis (Berke, Hyman, 2000).

Este fenômeno é crucial para o desenvolvimento da adição, uma vez que substâncias que a provocam (como a nicotina) são capazes de ativar a liberação de dopamina no estriato, como foi visto anteriormente.

### 1.2.3 O receptor 5-HT<sub>2A</sub> e o tabagismo

Dois tipos de receptores alvo podem ser pesquisados em relação ao tabagismo no sistema nervoso central. Os receptores de **nicotina** ou os **receptores relacionados ao circuito envolvido com o desenvolvimento de adição em geral**.

Utilizando-se a segunda estratégia, os neurotransmissores mais diretamente envolvidos são a **dopamina** (área ventral tegmental → estriado) e o **glutamato** (córtex e amígdala → estriado).

O sistema dopaminérgico foi alvo de intensa pesquisa em relação ao tabagismo. Foram identificados polimorfismos genéticos tanto nos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>4</sub> quanto no transportador da dopamina (Arinami, 2000).

Comings e cols (1997) demonstraram relação entre um polimorfismo (*Dde I*) do gene que codifica o receptor D<sub>1</sub> e o comportamento tabagista.

O polimorfismo denominado *TaqI A* do receptor D<sub>2</sub>, que determina uma menor disponibilidade de receptores deste tipo no estriato (alelo A1), está relacionado com a idade de início do fumo e como tempo máximo que os fumantes conseguem abster-se de fumar (Arinami, 2000 e Noble, 1994). Entretanto, outros autores (Spitz, 1998) não confirmaram estes resultados.

Um dos polimorfismos descritos no gene do receptor D<sub>4</sub>, que modula a afinidade da dopamina por este receptor, também está associado com o tabagismo. Em uma população “afro-americana”, nenhum dos sujeitos com o alelo L (que reduz a afinidade para a dopamina) continuou abstinente após 2 meses da parada do uso de tabaco, enquanto que 35% dos sujeitos com o alelo S (que codifica receptor com maior afinidade pela dopamina) permaneceu abstinente após este período. Esta relação não foi encontrada quando foram pesquisados sujeitos caucasianos (Arinami, 2000 e Shilds, 1998).

Outra estratégia foi o estudo de um polimorfismo (SLC6A3) do gene que codifica o transportador de dopamina. Lerman e cols. (1999), em um estudo caso-controle envolvendo fumantes e não fumantes, demonstrou que indivíduos com o alelo SLC6A3-9 têm menor tendência a serem fumantes, quando são começam a fumar mais tarde e ficam abstinente por mais tempo do que indivíduos sem este alelo.

Polimorfismos genéticos relativos a outras proteínas relacionadas com a função dopaminérgica como os receptores D<sub>3</sub>, D<sub>5</sub> e as enzimas catecol-O-metil transferase e mono amino-oxidase (que degradam a dopamina), são também interessantes de serem pesquisados em relação ao tabagismo.

Além destes sistemas, a **serotonina** também é um alvo lógico. Embora ela não esteja diretamente envolvida no “circuito da adição”, descrito anteriormente, ela participa de sua modulação. Por exemplo, a infusão do agonista 5-HT<sub>2A/2C</sub> DOI (1-[2,5-dimetoxi-4-idofenil]-2-aminopropano) aumenta a liberação de dopamina no córtex frontal; este efeito é revertido pela concomitante infusão de baixas doses de MDL100.907, que neste dose é um antagonista seletivo para receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Millan, 2000). Estes dados sugerem que os receptores 5-HT<sub>2A</sub> podem potencializar a neurotransmissão dopaminérgica originária da área ventral tegmental, como é o caso daquela envolvida com o desenvolvimento da adição.

Além disto, a serotonina também está envolvida com a regulação da neurotransmissão glutamatérgica. Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> modulam neurônios piramidais glutamatérgicos de três diferentes formas:

1. Indiretamente, aumentando a liberação de glutamato que facilita a atividade das células piramidais,
2. Indiretamente, aumentando a liberação de GABA que inibe a atividade das células piramidais e,
3. Diretamente, aumentando a atividade das células piramidais (Aghajanian, 2002).

Desta forma, o receptor 5-HT<sub>2A</sub> parece ser um bom candidato a ser estudado na adição, pois está envolvido com a modulação dos dois sistemas neuroquímicos diretamente implicados no desenvolvimento da adição, o dopaminérgico e o glutamatérgico.

#### **1.2.4 Outras evidências ligando a serotonina ao tabagismo**

Recentemente, polimorfismos do sistema serotoninérgico também foram alvo de pesquisa em relação ao tabagismo. Entretanto, os polimorfismos estudados codificam proteínas (hidroxilase do triptofano e transportador de 5-HT) que modulam o sistema serotoninérgico como um todo e não receptores específicos. Por outro lado sinalizam que a serotonina está envolvida no comportamento tabagista.

Dois estudos (Lerman, 2001 e Sullivan, 2001) investigaram o polimorfismo A799C da hidroxilase do triptofano, a enzima que limita a síntese de serotonina. Eles demonstraram que este polimorfismo está relacionado com a idade de iniciação ao fumo, mas não com a progressão a dependência. Indivíduos com alelos 799A iniciam a fumar mais cedo do que indivíduos 799C. Como este polimorfismo também está relacionada com impulsividade,

esta pode ser um traço que influencie a experimentação precoce do tabaco. Sullivan (2001) também descreveu a mesma associação com um outro polimorfismo da hidroxilase do triptofano, o C218A.

Ishikawa e colaboradores (1999) estudaram a influência de um polimorfismo do gene que codifica o transportador de serotonina e tabagismo em uma população japonesa. O alelo que determina um aumento da transcrição deste gene (aumento na quantidade de transportador e, portanto diminuição da função serotoninérgica) está relacionado com o desenvolvimento de tabagismo.

As evidências sugerem um envolvimento da serotonina como um todo com o comportamento tabagista, o estudo do polimorfismo genético de um receptor específico pode produzir informação mais detalhada e relevante.

### **1.3 O comportamento alimentar**

Nos últimos 20 anos um grande progresso foi realizado na pesquisa acerca da fisiologia do comportamento alimentar. Entretanto, apesar da identificação de inúmeros peptídeos relacionados com a regulação do comportamento alimentar (ente eles a leptina), o conhecimento de como e onde agem estes peptídeos nos circuitos neuronais pouco tem avançado (Smith e Geary, 2002).

Entre todas as substâncias pesquisadas, a que despertou o maior interesse foi a leptina porque havia a esperança de ela ser o sinal sintetizado e liberado pelo tecido adiposo que inibiria o comportamento alimentar, permitindo assim a crucial ligação entre armazenamento de energia e ingestão alimentar (Smith e Geary, 2002). Pesquisas

utilizando camundongos modificados geneticamente corroboraram esta visão. Obesidade e hiperfagia ocorrem em camundongos com deficiência genética na produção de leptina (*ob/ob*) ou nos receptores de leptina (*db/db*). Entretanto este entusiasmo inicial diminuiu com a constatação de que em pacientes obesos a leptina estava aumentada, ou seja, não era capaz de inibir a ingestão alimentar. O mecanismo pelo qual ocorre esta “resistência” à leptina, por diminuição de seu transporte até o cérebro ou pela diminuição da transdução intracelular do sinal após a ativação de seus receptores, está sob intensa investigação (Schwartz *et al*, 2000).

Tanto o progresso na área da identificação de substâncias envolvidas no comportamento alimentar quanto na compreensão dos mecanismos de aprendizagem e reforço deste comportamento focam em última análise o que leva uma pessoa a iniciar e interromper a alimentação, ou seja, frequência e quantidade de alimento. Pesquisas visando estabelecer que mecanismos regem a nossa preferência alimentar (o que deve ser comido e não somente a quantidade e a frequência de cada refeição) não têm sido realizadas, sobretudo se considerarmos a preferência por diferentes micro-nutrientes.

### **1.3.1 A serotonina e o comportamento alimentar**

A serotonina parece estar envolvida com a regulação do comportamento alimentar normal. Baseado em estudos animais foi sugerido que a 5-HT age na saciedade, diminuindo a ingestão de carboidrato, mas mantendo a de proteínas. Além disto, o sistema serotoninérgico pode indiretamente se opor ao sistema catecolaminérgico mediador da anorexia provocada pela anfetamina, que tem como característica retardar o início da ingestão de proteínas (Leibowitz e Shor-Posner, 1986).

### *O efeito de agonistas serotoninérgicos no comportamento alimentar*

Estudos em diversos modelos animais, empregando agonistas seletivos ou mistos, foram desenvolvidos para estabelecer o papel de cada um dos diferentes receptores serotoninérgicos no comportamento alimentar.

A estimulação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> através da ipsapirona em baixas doses induz hiperfagia provavelmente por estimulação de auto-receptores e conseqüentemente diminuição na neurotransmissão serotoninérgica, enquanto que o uso de altas doses também estimula receptores pós sinápticos, provocando um leve efeito anorexígeno (De Vry e Schreiber, 2000).

Já o agonista do receptor 5-HT<sub>1B</sub> CP-94.253 provoca hipofagia em diversos modelos animais. O padrão de comportamento obtido sugere que a estimulação deste receptor tanto acelera o desenvolvimento da saciedade quanto diminui o apetite, além de não ocasionar hiperfagia rebote (De Vry e Schreiber, 2000).

O emprego do agonista do receptor 5-HT<sub>2B</sub> BW723C86 apresentou resultados conflitantes em diversos modelos animais de comportamento alimentar. Por exemplo, em condições que propiciam alta ingestão de alimentos, como em ratos privados de alimentos, este fármaco provocou hipofagia, enquanto que em condições alimentares normais ele provocou hiperfagia (DeVry e Schreiber, 2000). Já o agonista do receptor 5-HT<sub>2C</sub> ORG37684 em diversos paradigmas animais promove hipofagia dose dependente além de hiperfagia rebote (De Vry e Schreiber, 2000).

O uso dos agonistas mistos de receptores 5-HT<sub>1B/2C</sub> TFMPP e *m*-CPP induzem consistentemente em vários modelos animais uma pronunciada diminuição da ingestão de alimentos, acompanhada de hiperfagia rebote. O padrão de resposta sugere tanto uma

aceleração no desenvolvimento da saciedade quanto uma diminuição do apetite. Este efeito é observado até em animais privados de alimentos (De Vry e Schreiber, 2000).

Além disto, um potente efeito hipofágico é desencadeado pelo uso do agonista misto de receptor 5-HT<sub>2A/2C</sub> DOI que é de curta duração e não promove hiperfagia rebote (De Vry e Schreiber, 2000).

#### *O efeito de antagonistas serotoninérgicos no comportamento alimentar*

Com o intuito de determinar o papel específico de cada receptor serotoninérgico no comportamento alimentar, foram realizados em modelos animais estudos associando agonistas mistos e antagonistas específicos.

Assim sendo, foi demonstrado que a hipofagia induzida pelo agonista misto de receptor 5-HT<sub>1B/2C</sub> TFMPP pode ser revertida pelo uso de  $\beta$ -bloqueadores que são antagonistas 5-HT<sub>1B</sub>, sugerindo que o bloqueio deste receptor é importante para o comportamento alimentar observado. Entretanto, a cetanserina (um bloqueador misto de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, que não possui atividade em receptores 5-HT<sub>1B</sub>) também reverte em grande parte o efeito do TFMPP, sugerindo que os receptores 5-HT<sub>2C</sub> também são importantes para o desenvolvimento da hipofagia por ele provocada (De Vry e Schreiber, 2000).

O estudo do efeito do efeito do *m*-CPP, que é agonista 5-HT<sub>2C/1B</sub>, além de antagonista 5-HT<sub>2B</sub> (três receptores envolvidos no comportamento alimentar), apresenta resultados complexos. A metergolina e a metisergida, que são inibidores não seletivos do receptor 5-HT<sub>2C</sub>, bloqueiam parcialmente, mas incompletamente, o efeito hipofágico do *m*-CPP, sugerindo novamente que este receptor está envolvido na diminuição da ingestão alimentar (De Vry e Schreiber, 2000).

Quanto ao robusto efeito hipofágico provocado pelo agonista 5-HT<sub>2A/2C</sub> e antagonista 5-HT<sub>2B</sub> DOI, o emprego de antagonistas não seletivos 5-HT<sub>2A</sub>, como a cetanserina e o espiperone, sugere que este receptor está intensamente envolvido na ação do DOI no comportamento alimentar. Entretanto, não se pode afastar a importância do simultâneo bloqueio de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, o que é sugerido pelo fato de que o emprego concomitante do antagonista 5-HT<sub>2A</sub> específico MDL100.907 falha em abolir consistentemente o efeito hipofágico do DOI (De Vry e Schreiber, 2000).

#### *O efeito da infusão de serotonina no comportamento alimentar*

Thibault e colaboradores (1999), desenvolveram um estudo que demonstrou o efeito da serotonina na escolha do tipo de dieta, não somente na quantidade. Eles infundiram serotonina no núcleo supra-quiasmático de ratos aos quais eram oferecidos três tipos de dieta ricas em macro-nutrientes. Os animais tratados com serotonina apresentaram uma diminuição na ingestão de alimento rico em caseína, sugerindo que a serotonina pode estar envolvida em um fenômeno de seleção de dieta ou “fome específica”.

#### *Estudos associando polimorfismos genéticos de receptores de serotonina e transtorno do comportamento alimentar*

Vários estudos foram realizados verificando a distribuição genotípica do polimorfismo -1438A/G, localizado na região promotora do receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Kaye e Strober, 1999). É importante ressaltar que este polimorfismo está em perfeito “desequilíbrio de transmissão”, ou seja, é segregado conjuntamente com o polimorfismo T102C do mesmo receptor (Veenstra-VanderWeele, 2002). A maioria destes estudos demonstrou uma maior frequência do alelo -1438A em pacientes com anorexia nervosa (Collier *et al*, 1997, Enoch

*et al*, 1998 e Sorbi *et al*, 1998). Entretanto outros autores encontraram resultados discrepantes. Por exemplo, Nishiguchi e colaboradores (2001) encontraram uma maior frequência do alelo G, e não do alelo A como a maioria dos outros autores, em pacientes com bulimia nervosa e não nos sujeitos com anorexia nervosa. Além disto, a maior frequência deste alelo estava associada com a ocorrência concomitante de transtorno de personalidade limítrofe.

### **1.3.2 O receptor 5-HT<sub>2A</sub> e o comportamento alimentar**

Baseado nos estudos com animais que relacionam a serotonina ao comportamento alimentar, os receptores do tipo 1A, 1B, 2A, 2B e 2C são alvos interessantes de estudo. Todos diminuem a ingestão de alimentos, com exceção do receptor 5-HT<sub>2B</sub>, que parece aumentá-la (De Vry e Schreiber, 2000). Já os estudos com pacientes que sofrem de transtornos do comportamento alimentar demonstraram o envolvimento do receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Kaye e Strober, 1999).

O estudo aqui proposto é original, pois não se trata de examinar a quantidade total de calorias ingeridas ou de examinar pacientes com transtorno do comportamento alimentar. A abordagem é a de determinar se a serotonina está envolvida com a escolha de determinados alimentos em uma população saudável. Ou seja, o estudo diz respeito acerca dos mecanismos que determinam a nossa preferência alimentar. Assim sendo, embora não seja o mesmo assunto, o único ponto de partida possível é a escolha de um receptor que esteja relacionado com o comportamento alimentar em geral, de preferência em estudos com humanos. Desta forma, o polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi escolhido,

por ser o único receptor consistentemente estudado no comportamento alimentar de pacientes com este tipo de patologia.

#### **1.4 A genética molecular como ferramenta nos estudos neuroquímicos**

A pesquisa necessita de ferramentas. Com o emprego destas, modelos experimentais são elaborados no intuito de responder a perguntas específicas e relevantes. Cada nova ferramenta desenvolvida abre inúmeras possibilidades de novas pesquisas.

Uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada na pesquisa em neuroquímica é a biologia molecular, pois permite a identificação de variações genéticas interindividuais. Através dela podemos detectar mudanças na estrutura nucleotídica de genes que codificam proteínas importantes na fisiologia do sistema nervoso central. Estas mudanças podem ter diferentes conseqüências. Por exemplo, no caso de este gene codificar um receptor, a variação genética pode levar a modificação de sua estrutura através da substituição de um aminoácido, fazendo com que o mesmo se torne menos ou mais funcional, ou pode acarretar somente a diminuição na sua expressão, promovendo a diminuição do número de receptores sem que haja a alteração de sua estrutura. Nestes dois casos, utilizando-se uma ferramenta da genética, a genotipagem, pode-se ter acesso a uma informação altamente relevante ao campo da neuroquímica, a alteração na funcionalidade ou no número de um determinado tipo de receptor (Nestler *et al*, 2001).

Entretanto, do ponto de vista prático este casamento entre uma técnica oriunda da genética para a produção de informações relevantes para a bioquímica, representa um desafio, uma vez que cada uma destas áreas do conhecimento desenvolveu tecnologias

específicas e distintas. Além disto, e talvez um obstáculo mais difícil de ser superado, cada uma delas apresenta um corpo teórico complexo e diferente entre si que precisa ser trabalhado em conjunto tanto no delineamento experimental quanto na análise e interpretação dos resultados.

Apesar destas dificuldades, é inegável que a genotipagem através de técnicas de biologia molecular abriu uma nova e vasta gama de possibilidades para a pesquisa em neuroquímica. Isto porque, até então a grande parte dos estudos neuroquímicos em humanos era centrada em indivíduos com doenças ou disfunções. Além do poder da informação obtida propriamente dito, que permite estudos tanto em indivíduos saudáveis quanto afetados, deve-se salientar a facilidade na obtenção desta informação. Pode-se estudar um grande número de sujeitos, submetendo-os a uma entrevista para a obtenção de informações e a coleta de sangue, urina ou outro material orgânico para a realização da genotipagem. Para completar, apesar da genotipagem necessitar de sofisticada aparelhagem e técnicos altamente treinados, ela não chega ser uma técnica economicamente dispendiosa. Por estas características, informação relevante obtida sem riscos e a baixo custo, a genotipagem deve transformar-se em uma ferramenta cada vez mais empregada no estudo da neuroquímica (Cowan *et al*, 2002).

#### **1.4.1 Protocolo de estudo relacionando comportamento e polimorfismo genético**

A elaboração de um protocolo de pesquisa envolvendo um determinado comportamento alvo e um gene específico segue pressupostos básicos, expostos a seguir:

- 1- O comportamento a ser estudado, que denominamos de fenótipo, deve estar ao menos parcialmente, sobre influência genética,

- 2- Deve-se poder identificar um gene candidato, que geralmente codifica alguma proteína (enzima, receptor, transportador) envolvida com o fenótipo alvo,
- 3- Deve haver algum polimorfismo funcional no gene candidato.

## Capítulo 2 - Objetivos

O estudo da neuroquímica do comportamento, tanto normal como patológico, pode beneficiar-se com o emprego de técnicas de gentotipagem de receptores já previamente relacionados com este comportamento. Esta técnica pode trazer vantagens em relação ao uso de agonistas e antagonistas como classicamente é feito, em função de que fármacos altamente seletivos não são disponíveis para todos os receptores identificados. Além disto, tratando-se de uma técnica não invasiva e de baixo custo, pode ser utilizada em grandes amostras em pesquisas com populações humanas.

O objetivo desta tese é estudar a hipótese de que o receptor 5-HT<sub>2A</sub> está envolvido na modulação do tabagismo e do comportamento alimentar.

Como objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Demonstrar o papel de receptores 5-HT<sub>2A</sub> na adição ao tabaco,
2. Demonstrar o papel de receptores 5-HT<sub>2A</sub> na modulação da preferência alimentar.

## Capítulo 3 - Metodologia

A metodologia será apresentada de forma sucinta. Sua descrição extensa é disponível nos dois artigos originados com os resultados aqui obtidos, apresentados no capítulo 4.

### 3.1 Estudo sobre tabagismo

#### 3.1.1 Amostra

O estudo foi estruturado considerando os itens sugeridos por Little e colaboradores (2002) para avaliação e relato de associações gene doenças.

A população estudada incluiu um total de 625 indivíduos de ambos os sexos, não aparentados, recrutados de três diferentes fontes:

- i. 167 indivíduos recrutados de um estudo epidemiológico acerca de envelhecimento e doenças não transmissíveis, desenvolvido na cidade de Gravataí, região metropolitana de Porto Alegre (dados prospectivos). Este estudo visa estudar 10% da população de idosos desta cidade, e sua metodologia detalhada foi descrita em outra publicação (da Cruz *et al*, 2003).
- ii. 376 indivíduos recrutados de um SPA (Kur Hotel) localizado no município de Gramado, região “peri-metropolitana” de Porto Alegre (dados retrospectivos de prontuário).
- iii. 82 indivíduos recrutados do programa de tratamento do tabagismo do Hospital São Lucas da PUCRS de Porto Alegre (dados prospectivos).

Todos os parentes de primeiro e segundo grau foram excluídos para evitar um viés de frequência genética.

Não foi realizada estratificação desta amostra, em função da característica da população brasileira, incluindo a da região sul, onde foi realizada esta pesquisa. A estratificação é necessária em populações com diferentes etnias não miscigenadas. Esta é a realidade para os Estados Unidos e para a maior parte dos países da Europa ocidental, que apresentam lavas de migração recente. Entretanto não é o caso das grandes áreas metropolitanas brasileiras, onde se inclui a região metropolitana de Porto Alegre. Alves-Silva e colaboradores (2000) e Parra e colaboradores (2003), estudando a ancestralidade das populações de diferentes regiões brasileiras através do DNA mitocondrial, demonstraram que a massiva miscigenação entre europeus, ameríndios e africanos, durante os 500 anos da história do Brasil, produziu uma população relativamente homogênea nas grandes cidades brasileiras, inclusive na região metropolitana de Porto Alegre. Isto evidentemente não é o caso de pequenas cidades onde, em função do isolamento desta população, pode não ter havido miscigenação. Desta forma, a estratificação não foi realizada por ser impossível, em uma população essencialmente mestiça. Para testar possíveis diferenças entre as duas primeiras amostras, nós utilizamos o teste do qui-quadrado, e não foi encontrada nenhuma diferença estatística. Desta forma assumimos que estas amostras têm a mesma contribuição genética. Corroborando o desenho de pesquisa escolhido, análises recentes sugerem que o viés atribuível à estratificação da população é mínimo (Wacholder *et al*, 2000).

### **3.1.2 Coleta de dados**

Durante todo o procedimento de coleta de dados e de realização de procedimentos laboratoriais, os profissionais clínicos estavam cegos quanto a genotipagem e os profissionais de laboratório quanto ao status clínico.

Todos os sujeitos preencheram questionários que incluíam a coleta de diversas informações, entre as quais características demográficas (idade, sexo, etc) e dados em relação ao fumo. Na terceira população (todos fumantes) uma detalhada história (idade na iniciação do hábito de fumar, duração do hábito, quantidade de cigarros que fuma, tentativas de parar de fumar, e dependência á nicotina) foi colhida.

### **3.1.3 Status em relação ao tabagismo**

Os indivíduos eram classificados em três categorias, segundo o seu comportamento em relação ao tabaco. **Fumantes atuais** são aqueles que fumam no momento da entrevista 10 ou mais cigarros ao dia por pelo menos 3 meses. **Ex-fumantes** são aqueles indivíduos que fumavam no mínimo 10 cigarros por dia por pelo menos 3 meses, mas pararam de fumar há pelo menos 2 anos. **Não fumantes** são aqueles que nunca fumaram em sua vida.

Qualquer indivíduo que não se adequasse a uma destas categorias era afastado do estudo (por exemplo, fumando há 2 meses ou fumando somente 5 cigarros por dia há mais de três meses).

### **3.1.4 Análise molecular**

Os técnicos envolvidos com a genotipagem estavam cegos em relação aos dados clínicos (comportamento em relação ao fumo) dos sujeitos.

O polimorfismo do receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi determinado a partir de DNA isolado de linfócitos. A genotipagem do polimorfismo T102C foi realizada utilizando-se a reação da polimerase em cadeia descrita por Warren e colaboradores (1993) e posteriormente modificada por Tsai e colaboradores (1999).

### **3.1.5 Análise estatística**

Tanto as frequências dos alelos como dos diferentes genótipos foram testadas para verificar se estavam em equilíbrio de acordo com a lei de Hardy-Weinberg.

Foram utilizados o teste não paramétrico  $\chi$ -quadrado e o teste exato de Fisher (duas caudas) para verificar a associação entre a frequência dos alelos ou a distribuição genotípica entre os voluntários com diferentes hábitos em relação ao tabaco.

Análises multivariadas, incluindo sexo e idade, foram conduzidas com métodos de regressão múltipla logística.

## **3.2 Estudo sobre comportamento alimentar**

### **3.2.1 Amostra**

O estudo foi estruturado considerando os itens sugeridos por Little e colaboradores (2002) para avaliação e relato de associações gene doenças.

A população estudada incluiu um total de 240 indivíduos de ambos os sexos, não aparentados, recrutados de um estudo epidemiológico acerca de envelhecimento e doenças

não transmissíveis, desenvolvido na cidade de Gravataí, região metropolitana de Porto Alegre (dados prospectivos). Este estudo visa estudar 10% da população de idosos desta cidade, e sua metodologia detalhada foi descrita em outro artigo (da Cruz *et al*, 2003).

Desta forma, os sujeitos eram idosos, apresentando 60 anos ou mais. A decisão de optar por uma amostra de idosos é em função de que nesta faixa etária não ocorrem contingências que determinam variação na dieta, como ambiente profissional.

Não foi realizada estratificação desta amostra, em função da característica da população brasileira, incluindo a da região sul, onde foi realizada esta pesquisa, conforme já explicado anteriormente.

### **3.2.2 Avaliação da dieta**

A dieta espontânea foi acessada. Uma entrevista realizada por profissionais ou acadêmicos da nutrição solicitava aos voluntários que recordassem e relatassem tudo o que haviam comido nas últimas 24 horas, sempre inquirindo se aquele era seu padrão de dieta normal. Para verificar se o padrão relatado era realmente congruente com o hábito alimentar, uma segunda entrevista foi realizada em uma outra época do ano, pelo menos 1 ano e meio após a primeira entrevista.

Para o cálculo de macro e micro nutrientes, foi utilizado o programa de computador DietWin (Nutritional Assesment Vs 2.1.55) estruturado segundo valores nutricionais de alimentos disponíveis no Brasil. Este programa permite identificar a quantidade de cada micro-nutriente contido em cada alimento.

### **3.2.3 Análise molecular**

Os técnicos envolvidos com a genotipagem estavam cegos em relação aos dados clínicos (dieta) dos sujeitos.

O polimorfismo do receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi determinado a partir de DNA isolado de linfócitos. A genotipagem do polimorfismo T102C foi realizada utilizando-se a reação da polimerase em cadeia descrita por Warren e colaboradores (1993) e posteriormente modificada por Tsai e colaboradores (1999).

### **3.2.4 Análise estatística**

Tanto as frequências dos alelos como dos diferentes genótipos foram testadas para verificar se estavam em equilíbrio de acordo com a lei de Hardy-Weinberg.

Foram utilizados a ANOVA de uma via e posteriormente o teste de Bonferroni para analisar se os genótipos estavam ou não relacionados com a ingestão de macro ou micronutrientes.

Para testar possíveis vieses, foi realizada uma análise multivariada usando o modelo linear geral (GLM) seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

## Capítulo 4 - Resultados

A seguir estão anexados os dois artigos escritos com os resultados obtidos nesta tese.

Em primeiro lugar, o artigo intitulado “*Polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction*”, aceito para publicação no *American Journal of Medical Genetics*, na secção *Neuropsychiatric Genetics*, conforme carta anexa.

Resumindo, um grupo de 625 sujeitos, 167 provenientes de um estudo epidemiológico sobre envelhecimento na cidade de Gravataí (área metropolitana de Porto Alegre), 376 provenientes de um SPA localizado próximo à área metropolitana de Porto Alegre e 82 provenientes do programa de tratamento do tabagismo do Hospital São Lucas de Porto Alegre, foram estudados conforme o seu status em relação ao fumo (nunca fumou, ex-fumante ou fumante atual) e o polimorfismo genético T102C do receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Quando as três categorias de comportamento em relação ao fumo foram analisadas quanto ao polimorfismo, não foram encontradas diferenças. Entretanto quando os fumantes atuais foram comparados com os que nunca fumaram e ex-fumantes, houve diferença na distribuição do genótipo. Indivíduos homozigóticos para C tendendo a serem fumantes (aumento da chance em 63%). Portanto este polimorfismo (e por conseqüência o receptor 5-HT<sub>2A</sub>) está relacionado com o desenvolvimento da dependência.

O segundo artigo foi intitulado “*Is serotonin important to our food preference?*” e foi recentemente submetido para publicação no *Nutrition*.

Resumindo, um grupo de 240 sujeitos idosos recrutados de um estudo epidemiológico sobre o envelhecimento na cidade de Gravataí foram estudados conforme o seu padrão alimentar espontâneo e o polimorfismo genético T102C do receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Não houve

diferença na quantidade total de calorias, gorduras, carboidratos, vitaminas ou minerais ingeridos em relação a genotipagem. Entretanto, o alelo C determinou uma diminuição na quantidade e à proporção de proteínas ingeridas, bem como uma redução na quantidade dos aminoácidos triptofano, metionina, treonina e lisina ingeridos. Portanto, este polimorfismo (conseqüentemente o receptor 5-HT2A) parece estar relacionado com um fenômeno de fome específica.

**Polymorphism of 5HT<sub>2A</sub> serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction.**

PAS do Prado-Lima <sup>2,3</sup>, J M Chatkin <sup>4</sup>, M Taufer <sup>5</sup>, G Oliveira <sup>1</sup>, E Silveira <sup>1</sup>, CA Neto <sup>2</sup>, F Haggstram <sup>4</sup>, LC Bodanese <sup>4</sup>, IBM da Cruz <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>*Geriatrics and Gerontology Institute, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>2</sup>*Biochemistry Department, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, Brazil, CEP 90035-003, Brazil*

<sup>3</sup>*Behavioral Neurobiology Research Group, Biomedical Research Institute, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>4</sup>*School of Medicine, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>5</sup>*Institute of Biosciences, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP90610-000, Brazil*

Send correspondence to: Ivana Beatrice Manica da Cruz, Instituto de Geriatria e Gerontologia

Av. Ipiranga 6690 Porto Alegre, Brazil, CEP 90610-010, e-mail: dacruz@pucls.br,

telephone/fax: 55-51-33203000 Ramal 2322

**Keywords:** smoking; addiction; dependence; serotonin; 5HT<sub>2A</sub> receptors; polymorphisms;

T102C polymorphism

**Abstract**

Smoking behavior is influenced by genetic factors. Polymorphisms affecting the dopaminergic system have been linked to smoking habits. The aim of this study was to investigate if the T102C polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene is related to tobacco use, since this receptor modulates the mesolimbic dopamine system and the C allele is associated with reduced receptor gene expression. A sample of 625 subjects were genotyped and classified according to their smoking behavior (never, former or current smokers). We found differences in the distribution of the genotypes when the current smokers were compared with the

never+former smokers, suggesting that T102C polymorphism is associated with maintenance, but not with initiation of the smoking habit. The CC genotype was more frequent in the current smokers than in the never+former smokers ( $\chi^2=6.825$ ,  $p=0.03$ ). The odds ratio of being a current smoker with a CC genotype was 1.63, 95% CI 1.06-2.51.

### **Introduction**

Smoking behavior is influenced by genetic factors and several reports have shown the importance of them in smoking initiation as well as in nicotine dependence. A population-based investigation of 1898 female twins (Kendler et al, 1999) demonstrated that genetic factors are more important than environmental ones in smoking initiation (78% versus 22%) and in the development of nicotine dependence (72% versus 28%). Another study with 3356 Vietnam-era veteran male twins (True et al., 1999) showed that inheritability for nicotine dependence was 60.3%. Polymorphisms affecting the dopaminergic system ( $D_2$  and  $D_4$  dopamine receptor genes and dopamine transporter gene) have been linked to smoking-related behavior (Arinami et al., 2000).

Serotonin (5-HT), a neurotransmitter that regulates many cerebral functions, may also be involved. Serotonergic system polymorphisms, such as the tryptophan hydroxylase gene (Sullivan et al., 2001 and Lerman et al., 2001) and 5-HT transporter gene (Ishikawa et al., 1999), have been linked to smoking behavior. However, studies verifying the relationship between serotonergic receptors and tobacco addiction are not performed.

Currently, serotonergic receptors are divided into seven groups (5-HT<sub>1-7</sub>). The type 2 receptors are categorized into three sub-types (A, B and C). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene is located at chromosome 13. A T102C polymorphism has been described in this receptor, where the mutation involves the replacement of a cytosine by a thymine (Peroutka, 1998). This

substitution does not determine a change of amino acid in the receptor molecule, making it a silent polymorphism. Nevertheless the C allele determines a differential gene expression (Poleskaya and Sokolov, 2002), whereby a diminished synthesis of 5-HT<sub>2A</sub> receptors results.

Many studies have shown that 5-HT<sub>2A</sub> receptors play a role in schizophrenia and alcohol dependence, two disorders that are strongly associated with smoking behavior. Therefore, we investigated whether T102C gene polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor could be associated with the development and maintenance of the smoking habit.

## **Methods**

### *Subjects*

The Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. Informed consent was obtained from all individuals whose information was collected prospectively. The study was structured considering the checklist for reporting and appraising of gene-diseases associations proposed by Little et al. (2002). The study population included in the analyses was comprised of 625 unrelated, free-living individuals, recruited from three different sources:

- i. 167 subjects from an epidemiological study of aging and non-transmissible disease developed in the city of Gravataí, Porto Alegre metropolitan area (prospective data),
- ii. 376 subjects from a health spa facility near the metropolitan area of Porto Alegre (retrospective data from clinical records),
- iii. 82 subjects from the smoking treatment program of the São Lucas Hospital, Porto Alegre (prospective data).

We excluded first or second-degree relatives of subjects previously included to avoid genetic frequency bias. Alves-Silva et al (2000) and Parra et al (2003) studying the ancestry of the Southern Brazilian region population emphasized the massive inter-ethnic crosses occurred in 500 years of Brazilian history and underline that the large urban areas, such as Porto Alegre Metropolitan area (3,5 millions in habitants) do not present significant isolated ethnic groups. For this reason, we consider the sample source as a unique population, and no stratification is presented here. To test possible genetic or genotypic frequency differences from the two first samples, we used a chi-square test. We did not find any statistical differences and we assumed that these populations had the same genetic contributions.

The timing recruitment period, sample collection and analysis occurred between 2001 March until 2002 July. Clinical and laboratory staff was blind to genotype and smoking condition respectively, during all experimental procedures. All subjects completed a self-report questionnaires including demographic characteristics (age, gender) and smoking history (smoker only). Smoking history variables included age at smoking initiation, current smoking rate and nicotine dependence. Nicotine dependence was measured using the Fagerstrom Test of Nicotine Dependence (FTND) (Heatherton et al. 1991).

#### *Smoking status*

Subjects were classified into three categories regarding their smoking habits currently. *Current smokers* were individuals smoking 10 cigarettes or more per day for at least 3 months. *Former smokers* were individuals who had stopped smoking for at least two years. *Non smokers* were individuals who had never smoked. Subjects who did not fit into these categories were excluded. Nicotine dependence was measured using the FTND.

#### *Molecular analysis*

The 5-HT<sub>2A</sub> receptor polymorphism was determined from DNA isolated from lymphocytes using an extraction kit. Genotyping of the T102C polymorphism was done according to the polymerase chain reaction (PCR) method by Warren et al. (1993) with minor modifications as described by Tsai et al. (1999). Briefly, standard PCR was carried out in a 25- $\mu$ l volume containing 100 ng genomic DNA, 200 $\mu$ M of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 nM of the sense (5'TGTGCTACAAGTTCTGGCTT-3') and anti-sense (5'-GTGCAGTTTTTCTCTAGGG-3') primers, and 0.6 U DNA Taq polymerase. The PCR products were digested with HpaII (BM). The digestion products were separated by electrophoresis and visualized under UV light. The 102T allele PCR products remained uncut, with a single DNA band of 342 bp, whereas the 102C allele showed two bands of 216 bp and 126 bp. The quality measures of genotyping data were made based in Little et al. (2002).

#### *Statistical analysis*

The allele and genotype frequencies were tested to equilibrium by the Hardy-Weinberg law. The significance of allele frequency or genotype distribution among volunteers with different smoking habits was examined by non-parametric chi-square test or Fischer's exact test (two-tailed). Multivariate analyses, including sex and age effects, were conducted with multiple logistic regression methods and estimates of conditional relative risk and 95% confidence interval (CI). Statistical analyses were performed by means of the SPSS/PC Statistical Package Version 9.0 (SPSS Inc, IL, USA). All p-values were two-tailed. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. To test intervenient factors we performed a multivariate analysis using the Forward Wald logistic regression.

## Results

Table 1 shows the demographic data for all individuals, along with the genotype and allele distribution of the T102C polymorphism for the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and the frequency of smoking status.

TABLE I here

The multivariate regression model analyses showed no association between 5-HT<sub>2A</sub> polymorphism and smoking status based on gender or age.

We did not find differences in genotype distribution or in dose effect analyses when the individuals were divided into the three smoking categories (never, former or current smokers) or when the current + former smokers were grouped and compared with the never smokers.

However, when the never smokers and the former smokers were grouped and compared with the current smokers, statistical differences became apparent among genotypes frequencies. The current smoker group had a high frequency of the CC genotype and a lower frequency of the TT genotype than the never + former smoker group. We also observed a dose effect considering T102C polymorphism and smoking habits. The CC genotype was associated with current smoking behavior and TT genotype was related to the smoking behavior of the never + former smoker group (Table 2). These results suggest that this polymorphism is involved in the maintenance of the smoking habit and not with initiation of smoking. Therefore, further research is necessary to verify whether this polymorphism is related to the severity of tobacco dependence or response to treatment.

TABLE II here

The occurrence of CC genotype seems to increase the risk to be a current smoker and to be an ever smoker (current + former smoking behavior). CC individuals have a 63% greater

risk to be current smokers than the group of TT+TC subjects. On the other hand, the TT genotype seems to decrease the risk to be a current smoker, but not an ever smoker. Furthermore, the T allele seems to decrease the risk to be a current smoker but not an ever smoker (Table 3).

TABLE III here

We found that CC 5-HT<sub>2A</sub> genotype subjects try to stop smoking less than other ones. That is, 31.4% (n=13) CC subjects did not try to quit before, whereas just 6,7 % (n=2) and 17.3% (n=21) TT and CT subjects, respectively, did not try to stop smoking before of the interview. This association was independent of the gender and age.

### **Discussion**

Our findings suggest an association between 5-HT<sub>2A</sub> gene receptor polymorphism and maintenance of smoking but not smoking initiation. However, as the statistical association was between .03-.05 range could have resulted by chance where the *P* of >0.01 is a chance finding. This depends on *a priori* probability. We attempted to minimize this by replicating the findings in tree different subject groups, and we did not find significant differences among them. Of course, we cannot discard chance association, however some aspects related with the possible role of serotonergic system in tobacco addition could help us if the association could be consistent.

Previous studies have reported serotonergic system genes polymorphism association with addition, including smoking behavior as the Ishikawa et al. study (1999). The authors described the association between serotonin transporter gene polymorphism in the upstream regulatory region associated with decreased transcription efficiency of the 5-HTT-gene

promoter and smoking among Japanese males. The results suggested the presence of the L allele as significantly increased in smokers (37%) compared with that in nonsmokers (24%).

Additional studies analyzing others gene polymorphism serotonergic system-related were reported. Lerman et al. (2001) investigated the A799C polymorphism of tryptophan hydroxylase (the rate-limiting enzyme in the synthesis of 5-HT) gene and found an association with age of smoking initiation. They argued that a relationship between impulsive behavior and serotonergic abnormality could explain the finding that 799A allele individuals begin to smoke earlier than those with 799C alleles. Sullivan et al. (2001) studied the same polymorphism and found a similar association with smoking initiation and not with progression to nicotine dependence. They also detected the same association with another tryptophan hydroxylase gene polymorphism, the C218A.

As can see in the literature, until few years ago, the gene polymorphism association with tobacco addition was concentrated mainly on dopamine system. However, the neurochemical homeostasis includes the close relationship between dopamine and seronergic system.

Polesskaya and Sokolov (2002) developed a method to determine the effect of the T and C alleles of this polymorphism in gene expression. From heterozygous (C/T) subjects they determined the 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA molecules transcribed from the T or C alleles. This method did not involve the comparison of different individuals, making it possible to avoid effects of variation in demographic and tissue sampling. They demonstrated that the expression of allele C was ~20% lower than the expression of the T allele.

Studies shown that nicotine on tests of reinforcement and behavioral sensitization are primarily mediated through the mesolimbic dopamine system (Berke and Hyman, 2000). These

neurons are modulated by serotonergic system via 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Milan, 2000). In this case, the decrease in 5-HT<sub>2A</sub> receptors associated with C allele could be explaining the possible association with persistence in tobacco addition.

Additional studies could be conducted to clarify some open questions that this study does not answer. For this reason, the study described here could be considering a preliminary results and presented several limitations. One this limitation is population stratification related. Although the analysis were conducted in an admixture population, it is possible that ethnic admixture could bias the study results. However, recent analyses suggest that the extent of bias attributable to population stratification is minimal (Wacholder et al. 2000). However, in order to rule out population stratification and to validate the present findings, family studies of 5-HT<sub>2A</sub> and other candidate genes are warranted.

Substance abuse is complex and involves multiple genetic and environmental risk factors. Colhoun et al. (2003) commented that inability to replicate many results has led to increasing skepticism about the value of simple association study designs for detection of genetic variants contributing to common complex traits, and suggests that most important factors underlying incapacity to replicate these associations are publication bias, failure to attribute the results to chance, and inadequate sample sizes. However, to conduce the large studies for one gene polymorphism or without previous report could be expensive and spent much time. In this context, despite the limitations, the present study together with other investigations published by Ishikawa et al. (1999), Sullivan et al. (2001), Lerman et al. (2001), corroborate the possible role of serotonergic genes in smoking behavior.

The importance of the findings described here is related with a smoking cessation treatment, mainly if we consider the high number of CC subjects that never try to stop

smoking before the interview. For the instance, complementary studies using pharmacogenetic approach could be performed.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Dr. Emílio Moriguchi, Dr. Yukio Moriguchi, Dr. Carla Helena Schwanke, Carin Gewher, Leni Araújo Leite, Ricardo Ehlers, Ivo EC Jung and other members of the Genesis Program.

We thank the CNPq (400195-1999/2) for grant support, and the FAPERGS and CAPES for fellowship resources.

### **References**

1. Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444-461.
2. Arinami T, Ishiguro H, Onaivi ES. 2000. Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. *Eur J Pharmacol* 410: 215-226.
3. Berke JD, Hyman S. 2000. Adiction, dopamine and molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
4. Colhoun H, McKeigue PM, Smith GD. 2003. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361:865-872.
5. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerstrom Ko. 1991. The Fagerstrom test for nicotine dependence: a revision of the Fagerstrom tolerance questionnaire. *Br J Addict* 86:1119-1127.
6. Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin YL, Yanagi H, Tsuchiya S, KawataK, Hamaguchi H, Arimani T. 1999. Association between

- serotonin transporter gene polymorphism and smoking among Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomark & Prevention* 8: 831-833.
7. Kendler KS, Neale MC, Sullivan P, Corey LA, Gardner CO, Prescott CA. 1999. A population-based twin study in women of smoking initiation and nicotine dependence. *Psychol Med* 29: 299-308.
  8. Lerman C, Caporaso NE, Bush A, Zheng YL, Audrain J, Main D, Shields PG. 2001. Tryptophan hydroxylase gene variant and smoking behavior. *Am J Med Genet* 105: 518-520.
  9. Little J, Bradley L, Bray M, Clyne M, Dorman J, Darrel L, et al. 2002. Reporting appraising and integrating data on genotype prevalence and gene-disease associations. *Am J Epidem* 156: 300-310.
  10. Millan MJ, Lejeune F & Gobert A. 2000. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressants agents. *J Psychopharmacol* 14: 114-138.
  11. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 100:177-182.
  12. Peroutka SJ. 1998. *Ann N Y Academy of Sciences* 861: 16-25.
  13. Polesskaya OO, Sokolov BP. 2002. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J Neurosci Res* 67: 812-822.

14. Sullivan PF, Jiang Y, Neale MC, Kendler KS, Straub RE. 2001. Association of the tryptophan hydroxylase gene with smoking initiation but not progression to nicotine dependence. *Am J Med Genet* 105: 479-484.
15. True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Bucholz KK, Heath AC, Eisen SA, Lyons MJ, Goldberg J, Tsuang M. 1999. Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Arch Gen Psychiatry* 56: 655-661.
16. Tsai SJ, Hong CJ, Hsu CC, Cheng CY, Liao WY, Song HL, Lai HC. 1999. Serotonin-2A receptor polymorphism (102 T/C) in mood disorders. *Psychiatry Res* 87: 233-237.
17. Wacholder S, Rothman N, Caporaso N. 2000. Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias. *J Natl Cancer Inst* 92:1151-1158.
18. Warren JT Jr, Peacock ML, Rodriguez LC, Fink JK. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR2): detection by DGGE and RFLP analysis. 1993. *Hum Mol Genet* 2: 338.

**Table I.** Demographic characterization of subjects

Number and gender	N (M/F%)	625 (42.5/57.5%)
Age	Mean±SD (years)	55.12±13.01
Smoking status	Never (%)	338 (54.1)
	Former (%)	94 (15.0)
	Current (%)	193 (30.9)
Genotype	TT (%)	125 (20.0)
	CC (%)	105 (16.8)
	TC (%)	395 (63.2)
Allelic frequency	T	0.52
	C	0.48

**Table II.** Genotype and allele numbers and frequencies in subjects between current smokers and never + former smokers

Genotypes	Smoking habit		Statistics <sup>1</sup>	
	Never+former smokers (n=432)	Current smokers (n=193)	$\chi^2$	P-value
TT (%)	95 (22.0)	30 (15.5)	6.825	0.03
CC (%)	63 (14.6)	42 (21.8)		
TC (%)	274 (63.4)	121 (62.7)		
Dose effect				
TT (%)	95 (22.0)	30 (15.5)	3.59	0.05
TC+ CC (%)	336 (78.0)	163 (84.5)		
CC (%)	63 (14.6)	42 (21.8)	4.42	0.03
TC+TT (%)	369 (85.4)	151 (78.2)		

<sup>1</sup>Chi-square likelihood ratio test was used to compare the genotype frequencies. <sup>2</sup>degrees of freedom (df)=4; <sup>3</sup>df=2

**Table III.** Odds ratio of T102C polymorphism and smoking status.

	<b>Ever smokers</b> (current+former smokers)		<b>Current smokers</b>	
	OR*	95% IC	OR	95% IC
Genotypes				
CC	1.57	1.03-2.39	1.63	1.06-2.51
TT	0.89	0.75-1.05	0.88	0.79-0.99
Alleles				
C	1.29	0.87-1.93	1.53	0.98-2.40
T	0.8	0.64-1.00	0.84	0.72-0.99

\*Odds ratio and 95% CI (confidence intervals) were calculated by multiple logistic regression analysis.

## Is 5-HT<sub>2A</sub> serotonergic receptor important to our food preference?

Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>2,3</sup>, Josiane Siviero<sup>1</sup>, Carla Helena Augustin Schwanke<sup>1</sup>, Gislaine Astir Flores<sup>1</sup>, Alexandre Manica da Cruz<sup>1</sup>, Maristela Taufer<sup>1</sup>, Leonardo Bittencourt<sup>1</sup>, Emilio Hideyuki Moriguchi<sup>1</sup>, Carlos Alexandre Netto<sup>2</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Geriatrics and Gerontology Institute, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>2</sup>*Biochemistry Department, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, Brazil, CEP 90035-003, Brazil*

<sup>3</sup>*Behavioral Neurobiology Research Group, Biomedical Research Institute, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP 90610-000, Brazil*

<sup>4</sup>*Institute of Biosciences, PUCRS, Av Ipiranga 6690, Porto Alegre, CEP90610-000, Brazil*

Corresponding author: Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima, Rua Álvares Machado 44-305, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90630-010. Phone/Fax 55-51-33304577, e-mail [paspl@uol.com.br](mailto:paspl@uol.com.br)

Key words: eating behavior, appetite, serotonin, 5-HT<sub>2A</sub> receptor, T102C polymorphism, tryptophane

### **Abstract**

*Objective:* Very few information is available about the mechanisms that rule what we decide to eat, not only how much. The aim of this study was to investigate if the T102C polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub>-receptor gene, that regulates the expression of this gene, is related to food preference.

*Research models and procedures:* A sample of 240 subjects was genotyped and diet habits recorded for macro and micronutrients.

*Results:* We found a relationship between the genotype and food preference, specifically individuals TT consumes more protein without a modification of the total eating of fats, carbohydrates or total caloric intake. They also ingest a major amount of all essentials amino acids, mainly because a core ingestion of beef, without a modification of the total caloric intake.

*Conclusions:* We suggest that the T102C polymorphism is implicated in the decision-making procedures regarding preference to protein intake.

## Introduction

There is little scientific information about the mechanisms that rule our food preference. It is conceivable that biological mechanisms beyond factors derived from culture or habit must influence the knowledge of those mechanisms could improve the efficiency of our eating behavior, adjusting the search and consumption of food to our organic needs. For instances, there are some examples from human pathology illustrating such regulation: children with iron deficiency anemia could present geophagia. However, these mechanisms are not well established, particularly in someone without any specific pathology (Faith, 2004).

Serotonin, 5-HT, among the different neurochemical systems investigated so far, has been long implicated in eating behavior. For example, interventions that increase intrasynaptic 5-HT or directly activate 5-HT receptors (like the use of the control weight compound sibutramine) tend to reduce food intake and promote weight loss, whereas interventions that reduces serotonergic transmission or block serotonergic receptors could increase food consumption and cause weight gain (Blundel, 1984 and Leibowitz, Shor-

Posner, 1986). Furthermore, several serotonergic dysfunctions have been reported in people with binge eating disorders, bulimia and anorexia nervosa (Kaye and Strober, 1999).

Studies in rats also corroborate the hypothesis that 5-HT could have an effect in feeding behavior. For instance, stimulation of hypothalamic 5-HT<sub>2C</sub> or 5-HT<sub>1B</sub> receptors leads to a behaviorally specific hypophagic effect by accelerating satiety processes, stimulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors leads to a disruption of the feeding cascade and stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptors leads to a hyperphagic effect (De Vry and Schreiber, 2000).

One possible approach to investigate the putative mechanisms implicated in food preference is the study of eating behavior in people with different polymorphisms related to serotonergic receptors. This approach usually provides very specific information, not only if serotonin is implicated with these decision-making procedures regarding what we ate, but also which one of the multiple serotonergic systems is concerned. (Kaye and Strober, 1999)

Considering that, we decided to study if the genetic expression of a subgroup of 5-HT receptors, 5-HT<sub>2A</sub>, determined by a specific polymorphism of this receptor - T102C - could change the diet preference in a sample of a normal population; this receptor was selected because it has been implicated in eating behavior in animals (De Vry and Schreiber, 2000). Furthermore, previous studies reported its association with anorexia nervosa (Enoch, 1998) or bulimia nervosa (Nishiguchi, 2001), and a polymorphism (-1438G/A) in the promoter region of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene, that is in perfect linkage disequilibrium with T102C polymorphism (Veenstra-VanderWeele, 2002).

## **Methods**

## *Subjects*

The study was structured considering the checklist for reporting and appraising gene-diseases associations proposed by Little et al (2002). The study population included in the analyses was comprised of 240 free-living subjects from an epidemiological study of aging and non-transmissible disease developed in the city of Gravataí localized in Porto Alegre metropolitan area. An elderly sample was selected because the habitual diet pattern in this age group is well stabilized in relation to younger populations, whom work contingencies impose diet bias. We excluded first or second-degree relatives of subjects previously included to avoid genetic frequency bias.

Alves-Silva et al (2000) and Parra et al (2003) studying the ancestrally of the Southern Brazilian region population (using mtDNA techniques) demonstrated that the large urban areas, such as Porto Alegre Metropolitan area (3,5 millions in habitants), do not present significant isolated ethnic groups, representing a quite homogeneous population. Therefore, no population stratification is presented here.

The period for recruitment, sample collection and analysis occurred between 1999 March until 2002 July with two dietary assessment made in different time and different seasonal period.

The Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. Informed consent was obtained from all individuals.

### *Dietary assessment*

The spontaneous intakes of energy and nutrients were assessed. Dietary assessment for macro- and micronutrient was determined by a 24-hour recall asking if the dietary report was an habitual eating pattern or not. A second dietary assessment was made to verify whether the diet record was congruent with the habitual eating pattern in another season, at least one year and half after the first interview. 345 subjects were included in the first assessment; all subjects that presented discrepancies in the diet records or cognitive decline measured by Mini Mental State Examination or another health problem that could change or influence the regular diet were excluded. Additionally, food frequency questionnaire - FFQ- (Kabagambe et al 2001 and Hankin et al 1994) was made in subjects that were selected (n=240).

Interviewers for the recalls and FFQ were required to have at least Bachelor's nutrition or health undergraduate students. Their work was closely monitored for quality control among senior staff nutritionist by reviewing 100 percent of the collected data and by to 25 percent of the interviews.

The quantitative calculation of each macro and micronutrient was coded and analyzed using the Brazilian computer software DietWin Clinic (Nutritional Assessment Vs 2.1.55) structured from Brazilian food nutritional values. The macronutrient composition of Brazilian food was calculated from the World Health Organization and the micronutrients from the Dietary Reference Intakes (Trumbo et al 2001).

### *Molecular analysis*

Clinical and laboratory staff was blind to genotype and eating behavior respectively, during all experimental procedures.

The 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphism was determined from DNA isolated from lymphocytes using an extraction kit. Genotyping of the T102C polymorphism was done according to the polymerase chain reaction (PCR) method by Warren et al (1993) with minor modifications as described by Tsai et al (1999). Briefly, standard PCR was carried out in a 25- $\mu$ l volume containing 100 ng genomic DNA, 200 $\mu$ M of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 nM of the sense (5'TGTGCTACAAGTTCTGGCTT-3') and anti-sense (5'-GTGCAGTTTTTCTCTAGGG-3') primers, and 0.6 U DNA Taq polymerase. The PCR products were digested with HpaII (BM). The digestion products were separated by electrophoresis and visualized under UV light. The 102T allele PCR products remained uncut, with a single DNA band of 342 bp, whereas the 102C allele showed two bands of 216 bp and 126 bp.

#### *Statistical analysis*

The allele and genotype frequencies were tested to equilibrium by the Hardy-Weinberg law. The subjects were categorized by 5-HT<sub>2A</sub> genotypes and the macro-, micronutrients ingestion were compared among these using a univariate Anova One-Way followed by Bonferroni *post hoc* test. To test intervenient factors we performed a multivariate analysis using the general linear model (GLM) followed by Bonferroni *post hoc* test.

Statistical analyses were performed by means of the SPSS/PC Statistical Package Version 9.0 (SPSS Inc, IL, USA). All p-values were two-tailed. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant

## **Results**

General characteristics, genotype and allele frequencies of our elderly subjects are shown in Table I. The distributions of the T102C genotype was in Hardy-Weinberg equilibrium.

TABLE I HERE

The macronutrients consumption among 5-HT<sub>2A</sub> genotypes is presented in Table II. The energy intake was similar among 5-HT<sub>2A</sub> genotype groups as well as carbohydrate and lipidic intake. However the protein intake (g/day) was higher in TT when compared with other genotypes; this protein consumption raises the proportion of protein in the diet because another macronutrients were not change in association with 5-HT<sub>2A</sub> genotypes.

TABLE II HERE

The essential amino acids were also compared among subjects with different 5-HT<sub>2A</sub> genotypes. The data are shown in Table III. All essentials amino acids were more consumed by TT subjects.

TABLE III HERE

The intake of each kind of vitamin and mineral was analyzed in regard of genotype, and no difference was found (data not shown).

In order to establish the animal source of the protein intake, we analyzed the food frequency that is presented in Table IV. The main animal food source related with TT

subjects was beef. Another animal food did not present differences among 5-HT<sub>2A</sub> genotype subjects.

#### TABLE IV HERE

The results obtained from multivariate analyzes were independent of the intervenient factors such as sex, age and BMI.

### **Discussion**

Our results pointed out a relationship between the T102C polymorphism of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and food preference, since the TT subject intake higher protein than another CC and TC subjects. Additional, amino acids analyses showed that occurred a differential ingestion of all essentials amino acids, probably determined by increased beef ingestion.

There is same evidence of the involvement of 5-HT in these mechanisms. Using animal models, Thibault et al (1999) compared food and water intakes in rats that were infused during 7 days with 5-HT or artificial cerebrospinal fluid in the suprachiasmatic nucleus in a three-way selection of macronutrient-rich diets. They demonstrated a decrease in casein intake with the infusion of 5-HT, suggesting that this neurotransmission could influence preferential food intake.

In our study, the preferential food concept is corroborated by the fact that, in spite of a differential consumption of protein, there is no change in caloric energy intake among the different genotypes, suggesting an energy compensatory regulation from several macronutrient sources.

Subjects with TT phenotype have a slight lower body mass index (BMI) than TC or CC individuals. This may be consequence of the protein preference, despite of equal energy intake among these groups.

Individuals with TT genotype eat more beef than subjects with another 5-HT<sub>2A</sub> genotypes. Since milk or eggs intakes was high and fish intake was low in all genotypes, we can speculate if beef preference as a protein source is a cultural phenomenon, since in Southern Brazilian region people consume large quantities of this kind of meet. However, we could not rule out an influence of this genotype in beef preference itself, because in our sample chicken intake was in medium values, allowing a trend genotype associated if only animal protein intake was the corner feature.

We can only speculate about the possible mechanisms underling these findings. This polymorphism could influence protein intake in general or could influence an amino acid preference in particular, as already discussed. Since 5-HT is synthesized from tryptophane provide by diet, we hypothesize a model to explain the influence of this genetic polymorphism and food preference.

In an elegant study, Polesskaya et al (2002) demonstrated differential expression related to T102C polymorphism, using *post mortem* brain tissue. From heterozygous (C/T) subjects they determined the 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA molecules transcribed from the T or C alleles. This method did not involve the comparison of different individuals, making it possible to avoid effects of variation in demographic and tissue sampling. They demonstrated that the expression of allele C was ~20% lower than the expression of the T allele. Therefore, regardless of being a silent polymorphism (the receptor amino acid sequence is maintained), the T102C is a functional one.

The diminished amount of post-synaptic 5-HT<sub>2A</sub> receptors, determined by C allele, could provoke a major occupancy of auto receptors (mainly 5-HT<sub>1A</sub>), therefore decreasing 5-HT synthesis. In this scenario, a minor amount of tryptophan, which is the essential amino acid precursor of this neurotransmitter, is necessary. This highly speculative model has the advantage to integrate serotonergic precursor and receptor.

Although relevant, we consider this data as preliminary, and future studies are necessary to confirm the results obtained here. One limitation of this study is population stratification related. Even though the analysis were conducted in an admixture population, it is possible that ethnic admixture could bias the study results. However, recent analyses suggest that the extent of bias attributable to population stratification is minimal (Wacholder et al 2000). Another relevant methodological question is that the study was performed in elderly group and the data could not be generalized for all another ages. Investigations in samples with young population could be useful to understand if the association described here is universal. On the other hand, we can also consider that young group could have extensive diet variations related with working contingencies that could bias such research, problem avoided with the recruitment of an older sample. However, independent of the study's limitations, the results described here are instigating and, we believe, have relevance for the generations of the new hypothesis about how we decide what we have to eat, not only how much.

Eating behavior is complex and involves multiple genetic and environmental factors. Colhoun et al (2003) remark that failure to replicate many results has led to increasing skepticism about the value of simple association study designs for detection of genetic variants contributing to common complex traits. However, conduce large studies for one gene polymorphism without previous report could be expensive and spent much

time. In this context, the present study corroborates the possible role of serotonergic genes in eating behavior, influencing not only the amount but also the nature of food.

### *Acknowledgment*

We are indebt to Dr. Yukio Moriguchi, Ricardo Ehlers, Dr. Rosane Azevedo and others members of the Genesis Program.

We thank the CNPq for grant support, and the FAPERGS and CAPES for fellowship resources.

**Table I** Characteristics of the subjects

Characteristic	
N subjects (M/F)	240 (46/194)
Age +sd (years)	67.72± 8.13
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28.67±4.38
Waist-to-hip ratio (cm)	0.92±0.11
Waist circumference (cm)	92.62±11.03
Genotype frequency (%)	
TT	61 (25.4)
CC	53 (22.1)
TC	126 (52.5)
Allelic frequency	
T	0.517
C	0.483

**Table II** Macronutrients consumption among 5-HT<sub>2A</sub> genotypes in a Brazilian's elderly population

	<i>Genotypes</i>			<i>P</i> <sup>1</sup>
	TT	TC	CC	
N	61	126	53	
<b>Body mass index (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>27.42±3.81<sup>a</sup></b>	<b>29.05±4.32<sup>b</sup></b>	<b>29.19±4.90<sup>b</sup></b>	<b>0.036</b>
Energy intake (Kcal/week)	1627.83±524.78	1474.07±551.81	1586.64±529.72	0.148
<b>Proteins (g/day)</b>	<b>90.07±38.52<sup>a</sup></b>	<b>68.58±30.33<sup>b</sup></b>	<b>71.40±30.48<sup>b</sup></b>	<b>0.000</b>
Fats (g/day)	47.64±24.84	42.63±23.16	48.36±22.15	0.210
Carbohydrates (g/day)	208.46±68.74	202.32±88.18	215.14±78.94	0.223
<b>Protein proportion (%)</b>	<b>21.95±5.45<sup>a</sup></b>	<b>19.02±6.31<sup>b</sup></b>	<b>18.39±5.77<sup>b</sup></b>	<b>0.002</b>
Fat proportion (%)	25.76±7.65	25.81±8.48	27.02±6.86	0.605
Carbohydrates (%)	51.59±9.47	54.45±11.62	53.80±8.82	0.223

Values are expressed as means±sd. <sup>1</sup> Significance value, Anova One-Way. Means followed by different letters differ significantly by Bonferroni test in  $p < 0.05$ .

**Table III** Essential amino acids consumption among 5-HT<sub>2A</sub> genotypes in a Brazilian's elderly population

	<i>Genotypes</i>			<i>P</i> <sup>1</sup>
	TT	TC	CC	
Tryptophan	1053.74±464.56 <sup>a</sup>	810.75±378.98 <sup>b</sup>	851.21±433.10 <sup>b</sup>	0.001
Methionine	2799.77±1043.64	2304.69±964.18	2235.59±688.42	0.001
Valine	4011.37±2000.54	3289.17±1595.26	3500.44±1702.79	0.031
Threonine	3892.62±1813.90 <sup>a</sup>	3103.92±1373.48 <sup>b</sup>	3018.30±1049.69 <sup>b</sup>	0.001
Phenyllalanine	3284.25±1559.29	2588.16±1171.30	2755.87±1396.00	0.004
Leucine	5764.64±2963.10	4623.76±2339.90	4931.17±2459.43	0.015
Isoleucine	2036.75±1133.78	1515.63±774.40	1638.43±912.55	0.001
Lysine	5528.00±2357.82 <sup>a</sup>	4352.32±2034.79 <sup>b</sup>	4183.33±1404.32 <sup>b</sup>	0.000

Values are expressed as means±sd. <sup>1</sup> Significance value, Anova One-Way. Means followed by different letters differ significantly by Bonferroni test in  $p < 0.05$ .

**Table IV** Frequency of animal food according to the 5-HT 2<sup>A</sup> receptor gene T102C polymorphism in a Brazilian's elderly population three times for week, at least.

Animal protein food and products related	Genotypes (%)			<i>P</i> <sup>1</sup>
	TT	TC	CC	
<b>Beef</b>	<b>65.6</b>	<b>31.7</b>	<b>37.7</b>	<b>0.000</b>
Chicken	46.9	30.5	45.5	0.073
Eggs	93,9	96,2	93,2	0.690
Milk	91.8	83.8	90.9	0.274
Fish	2.0	1.9	0	0.646

<sup>1</sup>Significant level by chi-square non-parametric test. The analysis was made just in 198 subjects.

## References

- 1- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 444
- 2- Blundel JE. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 1984; 23: 1537
- 3- Colhoum H, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361: 865
- 4- De Vry J, Schreiber R. Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 341
- 5- Enoch M, Kaye W, Ozaki N, Mazzanti C, Retondo A, Greenberg B, Altemus M, Murphy D, Goldbloom D. 5-HT<sub>2A</sub> promoter polymorphism -1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive compulsive disorder. *Lancet* 1998; 351: 1785
- 6- Faith MS, Keller KL. Genetic architecture of ingestive behavior in humans. *Nutrition* 2004; 20: 127
- 7- Flostein MF, Flostein SE, McHugh PR. "Mini-Mental State"? A practical method for grading the cognitive state of patients for clinicians. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189
- 8- Hankin JH, Wilkens LR. Development and validation of dietary assessment methods for culturally diverse populations. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 198S
- 9- Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman, Campos H. Application of the method of triads to evaluate performance of food frequency

- questionnaires and biomarkers as indicators of long-term. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 1126
- 10-Kaye W, Strober M. The neurobiology of eating disorders. In: Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS, eds. *Neurobiology of mental illness*. Oxford: Oxford University Press, 1999: 891
- 11-Leibowitz SF, Shor-Posner G. Brain serotonin and eating behavior. *Appetite* 1986; 7: 1S
- 12-Little J, Bradley L, Bray M, Clyne M, Dorman J, Ellsworth DL, Hanson J, Khoury M, Lau J, O'Brien TR, Rothman N, Stroup D, Taioli E, Thomas D, Vainio H, Wacholder S, Weinberg C. Reporting, appraising and integrating data on genotype prevalence and gene-disease associations. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 300
- 13-Nishiguchi N, Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, shirakawa O, Higuchi S. Association between 5HT2A receptor gene promoter region polymorphism and eating disorders in Japanese patients. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 123
- 14-Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003; 100:177
- 15-Poleskaya OO, Sokolov BP. Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. *J Neurosci Res* 2002; 67: 812
- 16-Singhal S, Goyle A, Gupta R. Quantitative food frequency questionnaire and assessment of dietary intake. *Natl Med J India* 1998; 11: 268
- 17-Thibault L, Mok E, Nagai K, Wong CY.: Serotonin infusion in the SCN reduces casein ingestion in rats. *Physio Behav* 1999; 68: 37

- 18- Trumbo P, Yates AA, Schleck S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 2001; 101: 294
- 19- Tsai SJ, Hong CJ, Hsu CC, Cheng CY, Liao WY, Song HL, Lai HC. Serotonin-2A receptor polymorphism (102 T/C) in mood disorders. *Psychiatry Res* 1999; 87: 233
- 20- Veenstra-VanderWeele J, Kim SJ, Lord C, Courchesne R, Akshoomoff N, Leventhal BL, Courchesne E, Cook EH Jr. Transmission disequilibrium studies of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene (HTR<sub>2A</sub>) in autism. *Am J Med Genet* 2002; 114: 277
- 21- Wachouder S, Rothman N, Caporaso N. Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1151
- 22- Warren JT Jr, Peacock ML, Rodriguez LC, Fink JK. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR<sub>2</sub>): detection by DGGE and RFLP analysis. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 338.

## Capítulo 5 - Discussão

Nestes dois trabalhos foi possível demonstrar que o polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> está relacionado com o desenvolvimento da adição ao tabagismo e com a modulação da preferência alimentar, especificamente em relação a proteínas em geral e aos aminoácidos triptofano, metionina, treonina e lisina.

### 5.1 O receptor 5-HT<sub>2A</sub> e o tabagismo

Os resultados do estudo sugerem uma associação entre o polimorfismo do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> e a manutenção do tabagismo, não havendo influência na iniciação do hábito de fumar. Portanto este é um polimorfismo genético relacionado com a adição. Como os mecanismos que regem a adição são os mais relevantes na manutenção do uso de drogas aditivas, apesar de todos os problemas que este hábito acarreta (Berke e Hyman, 2000, Laviolette e van der Kooy, 2004), o maior conhecimento acerca da neuroquímica da adição, e conseqüentemente o polimorfismo T102C, são importantes do ponto de vista do prognóstico e tratamento do tabagismo.

O alelo que está relacionado com a manutenção do tabagismo é o alelo C, que determina uma diminuição em aproximadamente 20% na expressão gênica (Polesskaya, 2002), ou seja, uma diminuição na quantidade de receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

Apesar de não estar diretamente envolvido com o “circuito da adição”, este receptor está relacionado com a modulação de neurônios dopaminérgicos da área ventral tegmental e com neurônios piramidais glutamatérgicos, ambos diretamente envolvidos no desenvolvimento da adição (Berke, 2000 e Kalivas, 2002, Laviolette e van der Kooy,

2004). Desta forma, pode-se propor um modelo inserindo o receptor 5-HT<sub>2A</sub> na neuroquímica da adição.

Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> aumentam a liberação de dopamina no córtex frontal, portanto aumentam a atividade dos neurônios localizados na área ventral tegmental (que se projetam para o estriado além de outras estruturas). A diminuição da quantidade destes receptores pode diminuir a ativação destes neurônios, que estão relacionados tanto com o desenvolvimento da adição quanto com a manifestação da síndrome de abstinência (Berke, 2000). Veja o esquema exposto na figura 2.

Algumas evidências terapêuticas dão suporte a este modelo. Por exemplo, a bupropiona, que é um inibidor da recaptação de dopamina (aumenta a disponibilidade de dopamina), foi inicialmente lançada comercialmente como um antidepressivo e atualmente é preconizada no tratamento do tabagismo, por diminuir o desejo de fumar e promover um maior sucesso na tentativa de abandonar o tabaco (Jones, 2002).

Estudos de neuroimagem funcional utilizando câmera de emissão de pósitrons (PET) evidenciaram um outro mecanismo pelo qual o tabaco modifica a atividade de neurônios dopaminérgicos. A atividade da enzima monoaminoxidase do tipo B (MAO-B), que é responsável pela degradação intracelular da dopamina, pode ser estudada através do uso de [<sup>11</sup>C] L-deprenila, que é um fármaco inibidor seletivo da MAO-B. Utilizando este ligante, foi demonstrado que fumantes tem uma redução em aproximadamente 40% da atividade desta enzima em relação aos não fumantes e ex-fumantes (Fowler *et al*, 1996, Fowler *et al*, 1999). Portanto, o tabaco aumenta a atividade dopaminérgica também através deste mecanismo, a diminuição da degradação de dopamina.

A outra alça deste circuito são as vias glutamatérgicas originadas no córtex cerebral e amígdala e que convergem para os núcleos da base, estimulando os neurônios espinhosos

(Berke e Hyman, 2000, Heimer, 2003, Laviolette e van der Kooy, 2004). Estes neurônios glutamatérgicos são diretamente e indiretamente estimulados por receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Aghajanian e Sanders-Bush, 2002). Desta forma, a diminuição da quantidade dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> diminuiria a estimulação das vias glutamatérgicas.

Assim sendo, segundo nossos resultados, os indivíduos que teriam uma **menor estimulação serotonérgica** das vias ligadas a adição (**menor quantidade de receptores 5-HT<sub>2A</sub> estimulando** neurônios **dopaminérgicos** na área ventral tegmental e **glutametérgicos** no córtex cerebral e amígdala), são os que têm **maior possibilidade** de se tornarem aditos ao tabaco. Uma hipótese altamente especulativa seria se alguma substância contida no tabaco (nicotina ou talvez outra) suprisse o efeito menor que os receptores 5-HT<sub>2A</sub> estariam tendo pela menor expressão genética. Ou seja, o circuito, por uma menor estimulação endógena, estaria mais ávido por estimulações exógenas.

As pesquisas envolvendo a relação entre o tabagismo e o polimorfismo do receptor de dopamina do tipo D<sub>2</sub>, que é abundante no estriado sobretudo em neurônios espinhosos que se projetam para a parte externa do pálido (Berke e Hyman, 2000), apontam para a mesma direção. O alelo *TaqI* A1 do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor D<sub>2</sub> está associado com uma menor idade de início do tabagismo assim como uma menor capacidade de ficar em abstinência (Arinami *et al*, 2000). Este mesmo alelo está relacionado com uma menor disponibilidade de receptores D<sub>2</sub> no estriado (Arinami *et al*, 2000).

Toda e qualquer formulação de hipótese é prejudicada pelo fato de que não sabemos se estas pessoas têm realmente menos receptores 5-HT<sub>2A</sub> do que deveriam ter, apesar da evidência indireta pelo fato de o alelo C determinar uma menor expressão gênica (Polesskaya e Sokolov, 2002)

Outro aspecto importante a salientar, é que indivíduos CC fazem menos tentativas de parar de fumar do que os outros sujeitos. Ou seja, 31,4% dos sujeitos com genótipo CC não tentaram parar de fumar nunca, contra 17,3% dos TC e apenas 6,7% dos TT. Desta forma, este polimorfismo, e por consequência os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, tem um papel na motivação para o tratamento da adição ao tabaco. Este dado é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos para o tabagismo.

Os resultados que obtivemos têm uma importância prática na prevenção e tratamento do tabagismo. Como os sujeitos CC tendem a desenvolver adição ao tabaco e manter o seu uso, tentando menos parar de fumar, este polimorfismo pode ser desenvolvido como um teste para a identificação de indivíduos com maior susceptibilidade ao tabagismo, aqueles que não deveriam experimentar cigarros.

Outra aplicação, que não foi estudada em nossa pesquisa, é se o polimorfismo T102C está associado a uma resposta diferente aos tratamentos preconizados para o tabagismo. Ou seja, ele poderia ser utilizado em estudos de farmacogenética. Há um precedente neste sentido com este mesmo polimorfismo: Antipsicóticos atípicos, como a clozapina, risperidona e olanzapina, que entre outros efeitos bloqueiam os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, tendem a serem menos eficazes em pacientes CC (Basile *et al*, 2001, Peroutka, 1998). No caso do tabagismo, os tratamentos atualmente preconizados são ou a reposição trans-dérmica de nicotina ou o uso de bupropiona para diminuir a fissura provocada pela abstinência ao tabaco (Jones e Benowitz, 2002). Se houvesse uma associação entre o grau de resposta ao tratamento e cada um dos genótipos do polimorfismo T102C, este poderia ser utilizado para direcionar o tratamento do tabagismo. Além disto, como este polimorfismo está relacionado com a motivação a parar de fumar, ele também poderia ser testado como fator preditivo para resposta ao tratamento cognitivo-comportamental do tabagismo.

Nossos dados não podem ser generalizados para outras formas de dependência, entretanto alguns dados da literatura sugerem que este polimorfismo pode estar relacionado com outras adições. Hwu e Chen (2000), estudando uma população composta de sujeitos dependentes ao álcool, que abusavam de álcool e controles normais e o polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, demonstraram que, o abuso de álcool associado a problemas comportamentais estava relacionado com o alelo C. Aubert e colaboradores (2000), estudando uma população obesa, demonstrou que o polimorfismo -1438G/A do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> está relacionado com a quantidade de consumo de álcool.

Desta forma, este polimorfismo deve ser testado em outras adições, como por exemplo, ao álcool, à cocaína e a *cannabis*, para determinar se ele é um “gene do tabagismo” ou se está relacionado à adição em geral. Outro argumento em prol destas pesquisas é que o “circuito da adição” modulado pelo receptor 5-HT<sub>2A</sub> não é exclusivo da adição ao tabagismo, mas está envolvido também na adição ao álcool, aos opióides, à cocaína e a outros estimulantes do sistema nervoso central (Berke e Hyman, 2000, Nestler *et al*, 2001, Kalivas, 2002).

Algumas críticas poderiam ser feitas em relação metodologia empregada.

1. Não foi realizada a estratificação de população estudada. Entretanto, a população estudada pode ser considerada mestiça, uma vez que em grandes centros urbanos brasileiros como a área metropolitana de Porto Alegre, não apresentam significativos grupos étnicos isolados devido à intensa miscigenação. Esta conclusão advém dos estudos de Alves-Silva e cols. (2000) e Parra e cols. (2003), que estudaram a ancestralidade da população do sul do Brasil através da análise do DNA mitocondrial. Desta forma não é necessária

nem possível a estratificação. Além disto, análises recentes sugerem que a extensão do viés atribuída à estratificação é mínima (Wacholder, 2000).

2. O grau de significância estatística ficou entre 0,03 e 0,05. A confiança de que estes resultados não se devem ao acaso seria melhor se o valor de  $P$  fosse  $>0,01$ . Entretanto, para minimizar esta limitação, foram replicados os resultados em três diferentes grupos de sujeitos e não foi encontrada diferença entre eles, diminuindo a possibilidade deste achado ser devido à chance.

## **5.2 O receptor 5-HT<sub>2A</sub> e a preferência alimentar**

Os resultados do estudo sugerem uma relação entre o polimorfismo T102C do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> e a preferência alimentar.

Indivíduos TT (o alelo T determina uma maior expressão deste gene, portanto uma maior quantidade de receptor 5-HT<sub>2A</sub>) ingerem tanto uma maior quantidade absoluta de proteínas quanto uma maior proporção de proteínas em relação a outros macro-nutrientes. Não há uma preferência por um aminoácido específico, indivíduos TT ingerem uma maior quantidade de todos os aminoácidos em relação a indivíduos TC e CC. Também foi demonstrado que eles tendem a comer uma maior quantidade de carne vermelha.

Por outro lado, este polimorfismo não determina uma alteração na quantidade de alimentos ou calorias ingeridos, nem uma alteração no índice de massa corporal, nem de nenhum outro macro ou micro-nutriente especificamente.

Podemos considerar estes resultados como preliminares e novas pesquisas devem ser realizadas para confirmar os resultados aqui obtidos.

Algumas críticas podem ser feitas em relação à metodologia empregada.

1. Em primeiro lugar, os dados aqui coletados não podem ser extrapolados para a população em geral, sobretudo porque estudamos uma amostra de idosos. Esta decisão se deveu ao fato de que nesta faixa etária o hábito alimentar apresenta menores variações de um dia a outro, o que é desejável neste tipo de pesquisa. Sujeitos mais jovens usualmente trabalham, o que em si determina um viés no hábito alimentar (geralmente comem fora de casa, a dieta é de uma certa forma imposta por contingências sociais).
2. Outra crítica que poderia ser aventada é o fato de não haver sido feita estratificação da população estudada. Conforme o já discutido no item 5.1, não há necessidade de realiza-la nesta população.

Apesar das possíveis críticas, os dados apresentados são relevantes e instigantes, porque apontam para um mecanismo de “fome específica” e identificam parte do mecanismo neuroquímico subjacente.

Por exemplo, o fato de que, em indivíduos homozigóticos para o alelo T, haja um aumento da ingestão total de proteínas que não é acompanhado de um aumento na ingestão de calorias indica um mecanismo de regulação compensatório para os diferentes macronutrientes. Este raciocínio é corroborado pelo fato de haver uma maior proporção de proteínas na dieta.

Aubert e colaboradores (2000) estudaram a relação entre a dieta espontânea e o polimorfismo -1438G/A do receptor 5-HT<sub>2A</sub> em uma amostra de obesos. Eles não encontraram uma relação entre os diferentes genótipos e alguns dos parâmetros por nós

pesquisados, como ingestão de calorias, gorduras e carboidratos. Em relação à proteína, foi encontrada uma tendência ( $p = 0.056$ ) do alelo A ser associado a um menor consumo, o que é congruente com nossos resultados.

Indivíduos com o genótipo TT comem mais carne vermelha. Podemos interpretar este fato como um mecanismo cultural, uma vez que todos os indivíduos (TT, TC e CC) comem muitos ovos e tomam muito leite, entretanto comem pouco peixe. Desta forma, indivíduos TT teriam mais tendência a comer proteína e esta propensão se manifesta pela maior ingestão de carne vermelha porque em nossa cultura a preferimos. Por outro lado o consumo de carne de galinha é médio em todos os genótipos, ou seja, há uma margem para uma variação determinada pelo genótipo se a única questão fosse ingestão de proteína, e esta não ocorreu. Assim sendo, se impõe a pergunta se a preferência por carne vermelha é determinada por fatores neuroquímicos (preferência por determinados aminoácidos?) ou por fatores culturais?

Entre todos os micro-nutrientes pesquisados (gorduras poli-insaturadas, mono-insaturadas, saturadas, carboidratos, diversos minerais e diversas vitaminas), somente os aminoácidos essenciais foram os mais consumidos por indivíduos TT. Com os dados que dispomos não é possível estabelecer um mecanismo para esta preferência. Entretanto como o polimorfismo estudado determina uma expressão diferencial no gene de um receptor serotoninérgico, é tentador ligar este polimorfismo a um fenômeno de fome específica em relação ao triptofano, que é o aminoácido essencial precursor da serotonina. Desta forma, propomos um modelo altamente especulativo. Indivíduos com o alelo C, que determina uma menor expressão genética, teriam conseqüentemente uma menor quantidade de receptores 5-HT<sub>2A</sub>. Nestes indivíduos, uma vez a serotonina liberada na fenda sináptica, ela vai competir por uma menor quantidade de receptores pós sinápticos (5-HT<sub>2A</sub>) e uma

quantidade normal de auto-receptores (5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>), que tem como função inibir a atividade do neurônio serotonérgico. Nesta condição, há uma maior ocupação de auto-receptores que acarretam uma diminuição na síntese e liberação de 5-HT e conseqüentemente poderia haver uma menor necessidade do seu precursor, o triptofano. Apesar de altamente especulativo, este modelo tem a vantagem de integrar o receptor serotonérgico com a “fome” pelo precursor da serotonina. A figura 2 apresenta esquematicamente a hipótese acima formulada.

<b>GENÓTIPO</b>	<b>METABOLISMO DA SEROTONINA</b>	<b>AUTO-RECEPTOR</b> Principalmente 5-HT <sub>1A</sub>	<b>SEROTONINA NA SINAPSE</b>	<b>RECEPTOR 5-HT<sub>2A</sub></b>
CC	+	+++	+	+
TT	+++	+++	+++	+++

Figura 2. O alelo C determina uma menor expressão do gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> e, portanto, uma propensão a uma menor quantidade deste receptor. Neste caso, a serotonina liberada na sinapse vai competir pelos receptores ativando uma maior quantidade de auto-receptores que estão em número normal, inibindo a formação e liberação de serotonina.

Este modelo aceita a possibilidade de que a nossa preferência alimentar está regulada por um sofisticado mecanismo que visa suprir necessidades muito específicas do nosso organismo.

Recentemente a relação entre genética e preferência alimentar tem sido alvo de um crescente interesse, motivado pela identificação de um fenótipo, a capacidade de perceber no paladar o composto amargo 6-*n*-propiltiouracil, ligado a um gene localizado no cromossomo 7 (Faith e Keller, 2004). Os sujeitos que apresentam maior capacidade de

identificar o 6-*n*-propiltiouracil, têm uma preferência por alimentos menos gordurosos e vice-versa.

Existem evidências do envolvimento da serotonina em transtornos do comportamento alimentar. Vários estudos evidenciaram que o alelo A do polimorfismo -1438G/A do receptor 5-HT<sub>2A</sub> é mais freqüente em pacientes com anorexia nervosa e bulimia do que no grupo controle (Kaye e Stober, 1999). Seria interessante pesquisar se o polimorfismo T102C também está associado a estas patologias. Caso esta relação seja demonstrada, ao menos dois fatores poderiam influenciar este comportamento, tanto o mecanismo de fome específica quanto o de adição. Um fator em prol do mecanismo de adição é o fato de que o topiramato é eficaz no tratamento do alcoolismo (Johnson *et al*, 2003) e da bulimia (Hoopes *et al*, 2003, Hedges *et al*, 2003), além de controlar os episódios de comer compulsivo (do Prado-Lima e Bacaltchuk, 2002). Este fármaco é um antagonista do glutamato, neurotransmissor que está envolvido no circuito da adição (Berke e Hyman, 2000). Outro argumento de que o receptor 5-HT<sub>2A</sub> em tendo alguma influência na bulimia seria em função do seu papel no mecanismo da adição é o fato de que o polimorfismo T102C na alimentação de indivíduos normais influencia a preferência alimentar e não a quantidade de alimentos. Entretanto, não é possível descartar um mecanismo alternativo.

### **5.3 Integração**

O uso de polimorfismos genéticos pode ser uma ferramenta útil na pesquisa neuroquímica. Ele permite a exploração da atividade de um determinado receptor (ou enzima), o que muitas vezes é impossível com as técnicas farmacológicas tradicionais pela

falta de agonistas ou antagonistas seletivos. Além disto, permite o estudo de humanos, já que se trata de uma técnica não invasiva, requerendo somente a coleta de uma pequena amostra de sangue ou mesmo de urina. Ela deve se tornar cada vez mais popular assim que novos polimorfismos funcionais forem descobertos e a técnica de identificação deles for desenvolvida. Outro fator que possibilitará uma maior difusão destes procedimentos é a crescente diminuição do custo de cada exame, e num futuro breve, serão dezenas de polimorfismos pesquisados em um mesmo sujeito ao mesmo tempo, possibilitando mapear todos os segmentos de um sistema neuroquímico, por exemplo.

O polimorfismo aqui utilizado, o T102C, é uma ferramenta útil para o estudo da função do receptor 5-HT<sub>2A</sub> em humanos. Estes estudos são difíceis mesmo em animais uma vez que não existem agonistas puros para estes receptores (Millan, 2000). O fato de já ter sido demonstrado que a ocorrência do alelo C diminui a expressão deste gene em aproximadamente 20% (Polesskaya, 2002), ou seja, diminui a provavelmente a quantidade do receptor, torna este polimorfismo de especial interesse para o estudo do papel fisiológico do receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

Os dois estudos aqui desenvolvidos apresentaram resultados instigantes. Discriminaram um papel para o receptor 5-HT<sub>2A</sub> na manutenção do tabagismo, o que abre uma perspectiva para a realização de estudos farmacogenéticos e o desenvolvimento de novos tratamentos, além de uma perspectiva como teste prévio à escolha de uma terapêutica ou para prevenção do tabagismo, já que foi demonstrado que indivíduos CC que se tornam fumantes, tendem a posteriormente ter enorme dificuldade de abandonar o tabagismo. Em relação ao comportamento alimentar, foi identificado o envolvimento deste receptor em um fenômeno de “fome específica”, o que abre a possibilidade de uma maior compreensão nos mecanismos que regem a nossa escolha alimentar, e não somente nos mecanismos que

regulam a quantidade de alimentos que ingerimos, que é o que é tradicionalmente quase que exclusivamente pesquisado.

Desta forma, apesar da genotipagem de um polimorfismo ser uma técnica da genética molecular, ela representa uma ferramenta poderosa no estudo dos processos neuroquímicos subjacentes ao nosso comportamento, como foi o emprego da farmacologia, que de tão tradicional já foi incorporada pela “cultura bioquímica”.

## Capítulo 6 - Conclusões

Após a obtenção dos resultados experimentais e da sua análise concluímos que:

1. Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> estão relacionados com o desenvolvimento da adição ao tabaco,
2. Estes mesmos receptores estão implicados com a modulação da preferência alimentar. Especificamente estão relacionados a um fenómeno de “fome específica” para as proteínas, para a carne vermelha, e aminoácidos essenciais.

## Capítulo 7 - Perspectivas

Estes resultados abrem uma série de perspectivas para futuras pesquisas. Em relação ao tabagismo, estudos de farmacogenética podem ser desenvolvidos para a determinação do valor preditivo deste polimorfismo na resposta a tratamentos empregados para a interrupção do uso e manutenção da abstinência ao fumo (bupropiona e reposição trans-dérmica de nicotina, por exemplo). Também poderia ser verificado o valor preditivo deste polimorfismo em relação ao resultado da utilização de técnicas cognitivo-comportamentais, que também são empregadas no tratamento do tabagismo. Este polimorfismo também poderia ser utilizado como teste para a identificação de pessoas que não deveriam experimentar o fumo, por apresentarem uma maior suscetibilidade de desenvolvimento da adição. **Por fim, ele deve também ser testado em outras adições, como à cocaína e à *cannabis*.**

Em relação ao comportamento alimentar, nossos resultados são instigantes para o desenvolvimento de modelos animais para testar a hipótese altamente especulativa de que uma maior quantidade de receptores serotoninérgicos leva a um fenômeno de fome específica em relação ao triptofano. Além disto, este polimorfismo deve ser estudado em relação aos transtornos do comportamento alimentar. Os dados desta pesquisa também devem ser replicados em outras populações e em indivíduos não idosos.

Como já foi salientado, o emprego destas técnicas de genética molecular possibilitam o estudo de uma grande amostra (pelo baixo custo) de indivíduos normais (por não implicarem em risco) e de um receptor específico e, portanto provavelmente serão cada vez mais instrumentos utilizados na pesquisa em neuroquímica.

## Referências bibliográficas

- 1- Aghajanian GK, Sanders-Bush E. Serotonin. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. Neuropsychopharmacology, the fifth generation of the progress. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 15-34, 2002.
- 2- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. American Journal of Human Genetics, 67: 444-461, 2000.
- 3- Arinami T, Ishigoro H, Onaivi ES. Polymorphisms in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. European Journal of Pharmacology, 410: 215-226, 2000.
- 4- Aubert R, Betoulle D, Herbeth B, Siest G, Fumeron F. 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphism is associated with food and alcohol intake in obese people. International Journal of Obesity, 24: 920-924, 2000.
- 5- Basile VS, Masellis M, Ozdemir V, Meltzer HY, Macciardi FM, Kennedy JL. Applications of pharmacogenetics to schizophrenia: Emerging insights from studies of clozapine response and tardive dyskinesia. In: Breier A, Tran PV, Herrea JM, Tollefson GD, Bymaster FP. Current issues in the psychopharmacology of schizophrenia. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 85-110, 2001.
- 6- Berke J D, Hyman S E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. Neuron, 25: 515-532, 2000.
- 7- Blackburn J R, Pfaus J G, Phillips A G. Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. Progress in Neurobiology, 39: 247-279, 1992.
- 8- Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J. Association between 5-HT<sub>2A</sub> gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. Lancet, 350: 412, 1997.
- 9- Comings DE, Gade R, Wu S, Chiu C, Dietz G, Muhleman D, Saucier G, Ferry L, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Rugele LJ, MacMurray P. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. Molecular Psychiatry, 2: 44-56, 1997.
- 10- Cooper J R. Bloom F E, Roth R H. Serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine. In: Cooper J R. Bloom F E, Roth R H. The biochemical basis of neuropharmacology, Oxford University Press, Oxford, 7<sup>a</sup> edição, 352-409, 1996.
- 11- Cowan WM, Kopnisky KL, Hyman SE. The human genome project and its impact on psychiatry. Annual Review of Neuroscience, 25: 1-50, 2002.

- 12- Da Cruz I, Schwanke C, Flores G, Sivieiro J, da Cruz A, da Cruz B, Moriguchi E. Projeto Gravataí, um estudo longitudinal e interdisciplinar sobre o envelhecimento: Descrição da escolha do município. *Revista de Medicina da PUC/RS, Porto Alegre*, 13: 383-392, 2003.
- 13- De Vry J, Schreiber R. Effects of selected serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24: 341-353, 2000.
- 14- Di Chiara G. A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *Journal of Psychopharmacology*, 12: 54-67, 1998.
- 15- Enoch M, Kaye W, Ozaki N, Mazzanti C, Rotondo A, Greenberg B, Altemus M, Murphy D, Goldbloom D. 5-HT<sub>2A</sub> promoter polymorphism -1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive-compulsive disorder. *Lancet*, 351: 1785-1786, 1998.
- 16- Faith MS, Keller KL. Genetic architecture of ingestive behavior in humans. *Nutrition*, 20: 127-133, 2004.
- 17- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, Shea C, Wolf AP, Warner D, Zezulko I, Cilento R. Inhibition of MAO B in the brains of smokers. *Nature*, 379: 733-736, 1996.
- 18- Fowler JS, Volkow ND, Malison R, Gatley SJ. Neuroimaging studies of substance abuse disorders. In: Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS. *Neurobiology of mental disorders*. Oxford University Press, Oxford, 616-626, 1999.
- 19- Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 6<sup>a</sup> edição, 263-292, 1999.
- 20- Gonon F. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 17: 5972-5978, 1997.
- 21- Hedges DW, Reimherr FW, Hoopes SP, Rosenthal NR, Kemin M, Karin R, Capece JA. Treatment of bulimia nervosa with topiramate in randomized double-blind, placebo controlled trial, part 2: Improvement in psychiatric measures. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64: 1449-1454, 2003.
- 22- Heimer L. A new anatomical framework for neuropsychiatry disorders and drug abuse. *American Journal of Psychiatry*, 160: 1726-1739, 2003.
- 23- Hoopes SP, Reimherr FW, Hedges DW, Rosenthal NR, Kemin M, Karin R, Capece JA, Kervois D. Treatment of bulimia nervosa with topiramate in randomized

- double-blind, placebo controlled trial, part 1: Improvement in binge and purge measures. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64: 1335-1341, 2003.
- 24- Hwu HG, Chen CH. Association of 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. *American Journal of Medical Genetics*, 4: 797-800, 2000.
- 25- Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin YL, Yanagi H, Tsukiya S, Kawata K, Hamaguchi H, Arinami T. Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking among Japanese males. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8: 831-833, 1999.
- 26- Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma Jennie Z. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet*, 361: 1677-1685, 2003.
- 27- Jones RT, Benowitz NL. Therapeutics for nicotine addiction. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology, the fifth generation of the progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1533-1543, 2002.
- 28- Kalivas PW. Neurocircuitry of addiction. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology, the fifth generation of the progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1357-1366, 2002.
- 29- Kaye W, Strober M. The neurobiology of eating disorders. In: Carney DS, Nestler EJ, Bunney BS. *Neurobiology of mental illness*. Oxford University Press, Oxford, 891-906, 1999.
- 30- Kendler K S, Neale M C, Sullivan P, Corey L A, Gardner C O, Prescott C A. A population-based twin study in women of smoking initiation and nicotine dependence. *Psychological Medicine*, 29: 299-308, 1999.
- 31- Kimura M, Aosaki T, Hu Y, Ishida A, Watanabe K. Activity of primate putamen neurons is selective to the mode of voluntary movement: visually guided, self initiated or memory-guided. *Experimental Brain Research*, 89: 473-477, 1992.
- 32- Kopnisky K L, Hyman S E. Molecular and cellular biology of addiction. Davis K L, Charney D, Coyle J T, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology, the fifth generation of the progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1367-1379, 2002.
- 33- Laviolette SR, van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behavior. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 55-65, 2004.
- 34- Leibowitz SF, Shor-Posner G. Brain serotonin and eating behavior. *Appetite*, 7: S1-14, 1986.

- 35- Lerman C, Caporaso NE, Audrian J, Main D, Bowman ED, Lockshin B, Boyd NR, Shields PG. Evidence suggesting the role of specific genetic factors in cigarette smoking. *Health Psychology*, 18: 14-21, 1999.
- 36- Lerman C, Caporaso NE, Bush A, Zheng YL, Audrian J, Main D, Shields PG. Tryptophan hydroxylase gene variant and smoking behavior. *American Journal of Medical Genetics* 105: 518-520, 2001.
- 37- Louis M, Clarke P B S. Effect of ventral tegmental 6-hydroxidopamine lesions on the locomotor stimulant action of nicotine in rats. *Neuropharmacology*, 37: 1503-1513, 1998.
- 38- Millan MJ, Lejeune F, Gobert A. Reciprocal autoreceptor and heteroreceptor control of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic transmission in the frontal cortex: relevance to the actions of antidepressant agents. *Journal of Pharmacology*, 14: 114-138, 2000.
- 39- Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience.* McGraw-Hill, New York, 2001.
- 40- Nishiguchi N, Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, Shirakawa O, Higuchi S. Association between 5HT2A receptor gene promoter region polymorphism and eating disorders in Japanese patients. *Biological Psychiatry*, 50: 123-128, 2001.
- 41- Noble EP, St Jeor ST, Ritchie T, Syndulko K, St Jeor SC, Fitch RJ, Brunner RJ, Sparkes RS. D<sub>2</sub> dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Medical Hypotheses*, 42: 257-260, 1994.
- 42- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 177-182, 2003.
- 43- Petroutko S J. Serotonin receptor variants in disease: New therapeutic opportunities? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 861: 16-25, 1998.
- 44- Picciotto M R, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio L M, Pichl E M, Fuxe K, Changeux J P. Acetylcholine receptors containing the  $\beta$ 2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391: 173-177, 1998.
- 45- Polesskaya O O, Sokolov B P. Differential expression of the “C” and “T” alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal and schizophrenics. *Journal of Neuroscience Research*, 67: 812-822, 2002.
- 46- Do Prado-Lima, Bacaltchuck J. Topiramate in treatment-resistant depression and binge-eating disorder. *Bipolar Disorder*, 4: 271-173, 2002.

- 47- Salamone J D, Cousins M S, Snyder B J. Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: Empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 21: 341-359, 1997.
- 48- Shilds PG, Lerman C, Audrian J, Bowman ED, Main D, Boyd NR, Caporoso NE. Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7: 453-458, 1998.
- 49- Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80: 1-27, 1998.
- 50- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-671, 2000.
- 51- Smith G P, Geary N. The behavioral neuroscience of eating. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology, the fifth generation of the progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1665-1673, 2002.
- 52- Sorbi S, Nacmias B, Tedde A, Ricca V, Mezzani B, Rotella CM. 5-HT<sub>2A</sub> promoter polymorphism in anorexia nervosa. *Lancet*, 351: 1785, 1998.
- 53- Spitz MR, Shi H, Yang F, Hudmon KS, Jiang H, Chamberlain RM, Amos CI, Wan Y, Cinciripini P, Hong WK, Wu X. Case-control study of the D2 dopamine receptor gene and smoking status in lung cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 90: 358-363, 1998.
- 54- Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ. Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal apiny neurons in vivo. *Nature*, 394: 475-478, 1998.
- 55- Sullivan PF, Jiang Y, Neale MC, Kendler KS, Straub RE. Association of the tryptophan hydroxylase gene with smoking initiation but not progression to nicotine dependence. *American Journal of Medical Genetics*, 105, 479-484, 2001.
- 56- Thibault L, Mok E, Nagai K, Wong CY. Serotonin infusion in the SCN reduces casein ingestion in rats. *Physiology & Behavior*, 68: 37-45, 1999.
- 57- True W R, Xian H, Scherrer J F, Madden P A, Bucholz K K, Heath A C, Eisen S A, Lyons M J, Goldberg J, Tsuang M. Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Archives of General Psychiatry*, 56: 655-661, 1999.
- 58- Tsai SJ, Hong CJ, Hsu CC, Cheng CY, Liao WY, Song HL, Lai HC. Serotonin-2A receptor polymorphism (102C/T) in mood disorders. *Psychiatry Research*, 87: 233-237, 1999.
- 59- Veenstra-VanderWeele J, Kim SJ, Lord C, Courchesne R, Akshoomoff N, Leventhal BL, Courchesne E, Cokk EH Jr. Transmission disequilibrium studies of

the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene (HTR2A) in autism. *American Journal of Medical Genetics*, 114: 277-283, 2002.

60- Wachouder S, Rothman N, Caporaso N. Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias. *J of the National Cancer Institute*, 92: 1151-1158, 2000.

61- Warren JT Jr, Peacock ML, Rodriguez LC, Fink JK, An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR2): detection by DGGE and RFLP analysis. *Human Molecular Genetics*, 2: 338, 1993.

62- Wise R A. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual Reviews of Neuroscience*, 19: 319-340, 1996.

# Anexo

Carta de aceitação do artigo “*Polymorphism of 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction*” para publicação no “*The American Journal of Medical Genetics – Neuropsychiatric Genetics*”.

