JULIANA DA ROCHA DOS SANTOS

**Avaliação farmacogenética em pacientes tratados com
fármacos antitabagismo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima
Santos

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Juliana da Rocha dos

Avaliação farmacogenética em pacientes tratados com fármacos antitabagismo /
Juliana da Rocha dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas.

Orientador: Paulo Caleb Júnior de Lima dos Santos.

Descritores: 1.Vareniclina 2.Bupropiona 3.Farmacogenética 4.Abandono do
hábito de fumar 5.Polimorfismo genético 6.Receptor acetilcolina nicotínico subunidade
alfa4 7.Receptor nicotínico beta2 8.Citocromo P-450 CYP2B6 9.*ANKK1*

USP/FM/DBD-054/15

Dedicatória

Dedico esse trabalho a Deus, em primeiro lugar, o qual é tudo para mim.

Aos meus pais Deolinda e Gedeão e ao meu marido Sidnei que me apoiaram e me aconselharam em todos os momentos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Paulo Caleb

Obrigada por ter me ensinado a importância da responsabilidade e do cumprimento dos prazos e horários. Ensinou-me que críticas são realmente construtivas e que devemos estar preparados para ouvi-las. Ensinou-me que devemos nos cobrar e ter senso crítico conosco mesmo; no entanto, devemos ter tolerância e respeitar o trabalho dos outros. Nunca vi ninguém dotado de tanta sabedoria, sempre com uma frase filosófica que nos faz refletir. Disse-me muitas verdades, mesmo brincando; aliás, nunca conheci um orientador mais brincalhão e simpático do que você. Muito obrigada pela paciência e compreensão: sei que te dei bastante trabalho, mas esteja certo de que o seu esforço valeu a pena.

Ao meu amigo mestrando, Paulo Roberto

Muito obrigada meu grande amigo: sei que posso contar com a sua ajuda sempre que eu precisar. Esteve comigo em todos os momentos. Em relação à parte técnica e intelectual, nem preciso falar o quanto você foi fundamental para execução desse trabalho. Foram muitas aventuras e trabalho árduo para concluir esse projeto. Obrigada por compartilhar os pensamentos mais engraçados e malucos do mundo. Com certeza, demos muitas risadas.

Aos Doutores Alexandre Pereira, Jaqueline Issa e André Negrão

Obrigada pelas dicas, instruções, correções e pelo conhecimento proporcionado. Obrigada por terem aceitado ser integrantes da minha banca

examinadora. Podem ter a certeza de que a contribuição de vocês foi fundamental para a execução desse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Genética e cardiologia molecular, Noely, Renata Alonso, Carolina Watanabe, Mirian, Aline, Filipe, Leiliane, Carolina Capelli, Paula Fernanda, Patrícia, Fábio, Tatiane, Nilse, Marina, Renata Watanabe, Vytor, Joceli, Théo, André Vaquero e Luciana Turolla

Muito obrigada pelo auxílio e pela instrução na parte técnica desse trabalho e muito obrigada pela amizade, companhia, conselhos, brincadeiras e almoços juntos.

A Deus

Pai, obrigada por tudo; sei que, sem o Senhor, nada eu poderia ter feito; sei também que foi o Senhor que preparou a minha vinda ao LGCM, que escolheu o meu orientador, bem como o projeto que eu trabalharia. Muito obrigada por ter me inspirado, dado forças e me alegrado; sei, também, que muito mais o Senhor tem feito por mim, mesmo sem eu perceber.

À minha família

Obrigada por ter me ensinado princípios, a importância de Deus em nossas vidas, por ter me incentivado, me levantado e acreditado no meu futuro. E muito obrigada pelos conselhos. Amo vocês!

Ao meu marido Sidnei

Lindo, você é um presente de Deus na minha vida: não vivo mais sem você; obrigada por ter ficado acordado ao meu lado enquanto eu estudava, obrigada por me levar e buscar todos os dias no metrô, obrigada por orar por mim, por me aconselhar e motivar: te amo.

Ao CNPq, à FAPESP e à Comissão Científica

Agradeço o apoio financeiro para a execução desse trabalho.

*"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem
jamais penetrou em coração humano o que Deus
tem preparado para aqueles que o amam".*

1 Coríntios 2:9

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Tabagismo: panorama geral e dados epidemiológicos.....	01
1.2 Propriedades da nicotina.....	02
1.3 Fármacos antitabagismo de primeira linha.....	03
1.3.1 Vareniclina.....	03
1.3.1.1 Farmacodinâmica.....	03
1.3.1.2 Farmacocinética.....	04
1.3.2 Bupropiona.....	05
1.3.2.1 Farmacodinâmica.....	05
1.3.2.2 Farmacocinética.....	06
1.4 Farmacogenética.....	06
2 JUSTIFICATIVA.....	9
3 OBJETIVOS.....	10
3.1 Para os pacientes tratados com vareniclina.....	10

3.2 Para os pacientes tratados com bupropiona.....	10
4 MÉTODOS.....	11
4.1 Casuística.....	11
4.2 Comitê de ética em pesquisa.....	12
4.3 Escores de dependência à nicotina.....	12
4.4 Amostras biológicas.....	13
4.5 Extração e avaliação do DNA genômico.....	13
4.6 Padronização das genotipagens.....	15
4.6.1 Descrição dos polimorfismos e das metodologias de genotipagem adotadas.....	15
4.6.2 Desenho e seleção dos <i>primers</i>	16
4.6.3 Gradiente de temperatura dos <i>primers</i>	16
4.7 Genotipagem.....	17
4.7.1 Genotipagem pela metodologia de HRM.....	17
4.7.2 Genotipagem pela metodologia de RFLP.....	20
4.8 Análises estatísticas.....	24
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Características gerais e clínicas dos pacientes.....	26
5.2 Análises dos polimorfismos nos genes <i>CHRNA4</i> e <i>CHRNA2</i>	28
5.2.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396).....	28
5.2.2 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com os polimorfismos <i>CHRNA4</i> (rs2236196) e <i>CHRNA2</i> (rs2072660 e rs2072661).....	32
5.2.3 Análise haplotípica nos genes <i>CHRNA4</i> e <i>CHRNA2</i>	33

5.3 Análises dos polimorfismos nos genes <i>CYP2B6</i> e <i>ANKK1</i>	33
5.3.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo <i>CYP2B6</i> *4 (rs2279343).....	33
5.3.2 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com os polimorfismos <i>CYP2B6</i> *9 (rs3745274), *5 (rs3211371), *6 (rs3745274 + rs2279343) e <i>ANKK1</i> (rs1800497).....	36
5.3.3 Análise haplotípica no gene <i>CYP2B6</i>	37
5.3.4 Escores de FTND e Issa, de acordo com os polimorfismos nos genes <i>CHRNA4</i> , <i>CHRNA2</i> , <i>CYP2B6</i> e <i>ANKK1</i>	37
6 DISCUSSÃO	39
6.1 Para resultados dos polimorfismos nos genes <i>CHRNA4</i> e <i>CHRNA2</i>	39
6.2 Para os resultados dos polimorfismos nos genes <i>CYP2B6</i> e <i>ANKK1</i>	42
6.3 Limitações do estudo.....	46
7 CONCLUSÃO	47
8 ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	48
9 REFERÊNCIAS	50

APÊNDICE 1 – Teste de Fagerström para a dependência à nicotina (versão em português)

APÊNDICE 2 – Escore de consumo situacional Issa

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AC	Abstinência contínua
ANKK1	Gene que codifica uma proteína quinase envolvida em vias de transdução de sinal
Bgl II	Enzima de restrição proveniente do <i>Bacillus globigii</i>
BSA	Albumina de soro bovino
Bsr I	Enzima de restrição proveniente do <i>Bacillus stearothermophilus</i>
[C¹⁴]	Carbono 14 (isótopo radioativo do carbono de massa atômica 14)
CHRNA4	Gene que codifica a subunidade $\alpha 4$ dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
CHRNA2	Gene que codifica a subunidade $\beta 2$ dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
CYP2B6	Isoenzima integrante do complexo citocromo P450
CYP2B6	Gene que codifica a isoenzima CYP2B6
DN	Dependência à nicotina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleotídeos: dATP, dCTP, dGTP e dTTP
DRD2	Gene que codifica o receptor dopaminérgico do tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Escore Issa	Escore de consumo situacional Issa
FDA	Agência sanitária do governo americano que controla alimentos e fármacos - <i>Food and Drug Administration</i>
FTND	Teste de Fagerström para dependência à nicotina – <i>Fagerström test for nicotine dependence</i>
HRM	Análise da curva de melting - <i>High Resolution melting</i>
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>

InCor	Instituto do Coração, São Paulo – SP
K₃EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
Na₂EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
nAChR	Receptores acetilcolínicos nicotínicos
NaCl	Cloreto de sódio
NH₄Cl	Cloreto de amônio
NH₄HCO₃	Bicarbonato de amônio
OCT2	Transportador catiônico orgânico
OR	Taxa de risco - <i>Odds ratio</i>
PAF	Programa de Assistência ao Fumante
PCR	Amplificação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
RFLP	Restrição enzimática - <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
Sty I	Enzima de restrição proveniente da <i>Salmonella Typhi</i>
TAE	Tampão formado com Tris, Acetato e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris-HCl	Tris e ácido clorídrico
TRN	Terapia de reposição nicotínica
α4	Subunidade alfa 4 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
α7	Subunidade alfa 7 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
β2	Subunidade beta 2 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo (n=483).....	26
Tabela 2 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396).....	29
Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes tratados com vareniclina, de acordo com o polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396).....	30
Tabela 4 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos e o polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396).....	31
Tabela 5 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n=167) para o <i>CHRNA4</i> rs1044396.....	32
Tabela 6 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs2279343).....	34
Tabela 7 - Características clínicas e demográficas dos pacientes tratados com bupropiona, de acordo com o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs2279343).....	34
Tabela 8 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos e o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs2279343).....	35
Tabela 9 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com bupropiona (n=237) para o <i>CYP2B6</i> *4 (rs2279343).....	36
Tabela 10 - Variáveis em um modelo de regressão linear para o escore de FTND.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho do estudo.....	12
Figura 2 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396)	18
Figura 3 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs2236196)	19
Figura 4 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo <i>CHRNA2</i> (rs2072660)	19
Figura 5 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo <i>CHRNA2</i> (rs2072661)	19
Figura 6 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo <i>ANKK1</i> (rs1800497)...	20
Figura 7 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs3745274).....	22
Figura 8 - Eletroforese em gel 3% após reação RFLP com enzima <i>Bsr I</i> para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (3745274).....	23
Figura 9 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs2279343).....	23
Figura 10 - Eletroforese em gel 4% após reação RFLP com enzima <i>Sty I</i> para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (rs2279343).....	23
Figura 11 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (3211371).....	24
Figura 12 - Eletroforese em gel 1% após reação RFLP com enzima <i>Bgl II</i> para o polimorfismo <i>CYP2B6</i> (3211371).....	24
Figura 13 - Análise de desequilíbrio de ligação e frequência de haplótipos para os polimorfismos nos genes <i>CHRNA4</i> , <i>CHRNA2</i> (n=483) e <i>CYP2B6</i> (n=478) nos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo	28
Figura 14 - <i>Status</i> dos pacientes tratados com vareniclina, de acordo com o polimorfismo <i>CHRNA4</i> (rs1044396).....	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos fármacos, genes e polimorfismos analisados.....	15
Quadro 2 - Descrição dos <i>primers</i> desenhados pelo <i>software</i> Primer 3 para genotipagem por HRM.....	16
Quadro 3 - Descrição dos <i>primers</i> selecionados do artigo (Lang <i>et al</i> ⁸⁰) para genotipagem por RFLP.....	16
Quadro 4 - Enzimas, reagentes e fragmento gerados para cada polimorfismo	21

RESUMO

Santos JR. *Avaliação farmacogenética em pacientes tratados com fármacos antitabagismo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: A grande variabilidade individual em resposta a fármacos antitabagismo sugere que tratamentos específicos podem ser mais efetivos em determinados subgrupos de fumantes. No contexto de medicina personalizada, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar se polimorfismos nos genes *CHRNA4*, *CHRNA2*, *CYP2B6* e *ANKK1* estão associados com a resposta às terapias de cessação tabágica em pacientes provenientes de um programa de assistência ao fumante. **Métodos:** Estudo de coorte com 483 pacientes fumantes que receberam tratamento farmacológico (vareniclina, vareniclina e bupropiona, bupropiona em monoterapia ou coadministrada com terapia de reposição nicotínica). O sucesso na cessação tabágica foi considerado para os pacientes que completaram 6 meses de abstinência contínua. O teste de Fagerström para a dependência à nicotina (FTND) e o escore de consumo situacional Issa foram utilizados para avaliar a dependência à nicotina. Os polimorfismos *CHRNA4* (rs1044396 e rs2236196), *CHRNA2* (rs2072660 e rs2072661) e *ANKK1* (rs1800497) foram genotipados pela análise da curva de *melting* e os polimorfismos *CYP2B6* *9 (rs3745274), *4 (rs2279343), *5 (rs3211371) foram genotipados por restrição enzimática. **Resultados:** Os pacientes com o genótipo CC para o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396) obtiveram menor taxa de sucesso no tratamento com vareniclina (29,5%) em comparação com os portadores dos genótipos CT ou TT (50,9%) (P=0,007; n=167). Os genótipos CT ou TT foram associados com maior *odds ratio* para o sucesso (OR=1,67; IC 95%=1,10-2,53; P=0,02), em um modelo multivariado. Os pacientes com o genótipo AA para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343) obtiveram maior taxa de sucesso no tratamento com bupropiona (48,0%) em comparação com portadores dos genótipos AG ou GG (35,5%) (P=0,05; n=237). O genótipo AA foi associado com maior *odds ratio* para o sucesso no tratamento (OR=1,92; IC 95%=1,08-3,42; P=0,03), em um modelo multivariado. Não foram observadas diferenças significativas nos escores FTND e Issa com relação aos polimorfismos estudados. **Conclusão:** Os polimorfismos *CHRNA4* (rs1044396) e *CYP2B6* (rs2279343) estão associados com a cessação tabágica em indivíduos tratados com vareniclina e bupropiona, respectivamente. Sugere-se que estes polimorfismos influenciam a resposta farmacológica e podem ser importantes para o desenho de uma farmacoterapia individualizada.

Descritores: vareniclina; bupropiona; farmacogenética; abandono do hábito de fumar; polimorfismo genético; receptor acetilcolina nicotínico subunidade alfa4; receptor nicotínico beta2; citocromo P-450 CYP2B6; *ANKK1*.

ABSTRACT

Santos JR. *Pharmacogenetic evaluation in patients treated with drugs for smoking cessation* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Background: The large individual variability in response to drugs for smoking cessation suggests that specific treatments can be more effective in particular subgroups of smokers. In the context of personalized medicine, the main aim of the present study was to evaluate whether the *CHRNA4*, *CHRNA2*, *CYP2B6* and *ANKK1* polymorphisms are associated with response to smoking cessation therapies in patients from a smoker assistance program. **Methods:** This cohort study enrolled 483 smoking patients who received pharmacological treatment (varenicline, varenicline plus bupropion, bupropion in monotherapy or plus nicotine replacement therapy). Smoking cessation success was considered for patients who completed 6 months of continuous abstinence. Fagerström test for nicotine dependence (FTND) and Issa situational smoking scores were analyzed for nicotine dependence. The *CHRNA4* (rs1044396 and rs2236196), *CHRNA2* (rs2072660 and rs2072661) and *ANKK1* rs1800497 polymorphisms were genotyped by high resolution melting analysis and the *CYP2B6* *9 (rs3745274), *4 (rs2279343) and *5 (rs3211371) were genotyped by restriction fragment length polymorphisms. **Results:** Patients with *CHRNA4* rs1044396 CC genotype had lower success rate in treatment with varenicline (29.5%) compared with carriers of CT or TT genotypes (50.9%) ($P=0.007$, $n=167$). The CT or TT genotypes were associated with higher odds ratio for success ($OR=1.67$, $95\%CI=1.10-2.53$, $P=0.02$), in a multivariate model. Patients with *CYP2B6* rs2279343 AA genotype had higher success rate in treatment with bupropion (48.0%) compared with carriers of AG or GG genotypes (35.5%) ($P=0.05$, $n=237$). The AA genotype was associated with higher odds ratio for success ($OR=1.92$, $95\%CI=1.08-3.42$, $P=0.03$), in a multivariate model. We did not observe significant differences in the FTND and Issa scores according to the studied polymorphisms. **Conclusion:** The *CHRNA4* rs1044396 and *CYP2B6* rs2279343 are associated with smoking cessation in individuals on varenicline and bupropion therapies, respectively. We suggest that these polymorphisms influence the pharmacological response of these drugs and it might be important in the design of individualized pharmacotherapy.

Descriptors: varenicline; bupropion; pharmacogenetics; smoking cessation; polymorphism genetic; nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit; nicotinic receptor beta2; cytochrome P-450 CYP2B6; *ANKK1*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tabagismo: panorama geral e dados epidemiológicos

O tabagismo é um dos fatores de risco mais associados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, respiratórias, além de ser considerado uma das principais causas de morte por câncer ¹⁻⁵. Dados mostram que fumantes possuem risco cardiovascular aumentado em relação aos ex-fumantes, mesmo em comparação com indivíduos que tiveram histórico longo e intenso de uso do tabaco ¹.

Dados epidemiológicos recentes reportaram que, apesar da redução moderada da prevalência de fumantes em nível global, o número de fumantes diários aumentou significativamente de 721 milhões, em 1980, para 967 milhões, em 2012, no conjunto de 187 países verificados ⁶.

De acordo com a Pesquisa Especial de Tabagismo - PETAB (2008) ⁷, foi constatado que cerca de 24,6 milhões de brasileiros, a partir de 15 anos de idade, fumavam derivados de tabaco, correspondendo ao total de 17,2% da população nesta faixa etária. O maior percentual encontrava-se entre os homens (21,6%) e entre a faixa etária de 45 a 64 anos de idade (22,7%).

Pinto e Ugá ⁸ mostraram que, em 2005, aproximadamente 27% e 36% do total das internações realizadas em mulheres e homens, respectivamente, com idade igual ou superior a 35 anos, ocorreram devido a doenças atribuíveis ao uso do tabaco. As internações e os procedimentos de quimioterapia realizados para estes pacientes custaram para o SUS cerca de 340 milhões de reais no mesmo ano.

Embora a toxicidade do fumo esteja relacionada a outros componentes do cigarro, é a nicotina que desencadeia o processo de dependência ^{9, 10}. As razões farmacológicas para o uso continuado da nicotina envolvem melhora do humor, redução

da abstinência à nicotina e melhora do desempenho físico ¹¹. Diversos neurotransmissores, em um mecanismo complexo, medeiam os efeitos psicoativos da nicotina; contudo, as vias dopaminérgicas são as mais estudadas ¹². A nicotina ativa os receptores neuronais acetilcolínicos nicotínicos (nAChR), os quais provêm o aumento da liberação de dopamina mesolímbica ¹³. Neste cenário, o uso continuado da nicotina pode induzir a sensibilização, o desejo e a recaída, gerando toxicod dependência – que foi definida por Koob e Volkow ¹⁴ como uma desordem crônica caracterizada pelo uso de drogas e a perda de controle sobre elas.

A maioria dos fumantes reconhece os efeitos nocivos do tabagismo; no entanto, apenas 4 a 7% dos fumantes conseguem parar de fumar sem medicação ou sem tratamento formal ^{15, 16}.

1.2 Propriedades da nicotina

A nicotina é um alcaloide encontrado naturalmente na planta do tabaco, *Nicotiana tabacum*, que contém alta concentração de nicotina em suas folhas ¹⁷; é absorvida através dos alvéolos pulmonares, chegando rapidamente à circulação arterial, sendo distribuída pelos tecidos e atingindo o SNC em cerca de 10 a 19 segundos ^{18, 19}. Os níveis de nicotina no plasma, bem como no SNC, declinam rapidamente como resultado da distribuição para os tecidos periféricos ²⁰. A nicotina possui tempo de meia vida de aproximadamente 2 horas ²¹; cerca de 70 a 80% da nicotina é metabolizada em cotinina e 4% em nicotina N'óxido. A cotinina é metabolizada em 3'-hidroxicotinina, a qual pode ser encontrada em grande quantidade na urina. As vias do metabolismo da nicotina podem ser consideradas como fases I e II. A fase I envolve a oxidação microsossomal da nicotina e a fase II envolve o metabolismo da nicotina e seus

metabólitos, principalmente pelas enzimas do fígado, CYP2A6, CYP2B6 e CYP2E1, para a cotinina ^{22, 23}.

1.3 Fármacos antitabagismo de primeira linha

Os medicamentos de primeira linha para o tratamento do tabagismo, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), incluem vareniclina, bupropiona e terapia de reposição nicotínica (TRN) ¹⁵.

Uma metanálise de 16 estudos clínicos indicou que fumantes tratados com bupropiona apresentaram maior taxa de abstinência, quando comparados com aqueles recebendo placebo, com taxa de risco – *Odds ratio* (OR) – de 1,97 (IC 95% 1,67-2,34) para o sucesso no tratamento ²⁴. Já a vareniclina apresentou maior eficácia, comparada a outros medicamentos para a cessação do tabagismo aprovados pela FDA ^{15, 25, 26}, possuindo OR de 2,27 (IC 95% 2,02-2,55) em relação ao placebo, segundo metanálise de 14 artigos ²⁷.

1.3.1 Vareniclina

1.3.1.1 Farmacodinâmica

A vareniclina, desenvolvida especificamente para atuar nos receptores nAChR (subunidades $\alpha 4\beta 2$), nos quais possui alta afinidade e seletividade, age como um agonista parcial, um composto que apresenta atividades tanto agonista, com eficiência intrínseca menor do que a nicotina, quanto antagonista na presença de nicotina. Embora também atue em outros subtipos de nAChR, como, por exemplo, em nAChR compostos pela subunidade $\alpha 7$, a sua maior afinidade é pelos nAChR compostos pelas subunidades $\alpha 4\beta 2$ ^{15, 28}. O mecanismo de ação da vareniclina promove diminuição no desejo de

fumar, facilitando o processo de abstinência ao tabaco ¹⁵. Evidências associam a náusea como um dos eventos adversos mais comuns no uso da vareniclina ²⁹.

1.3.1.2 Farmacocinética

A absorção gastrointestinal da vareniclina é quase completa após a sua administração oral (>90%), alcançando concentrações plasmáticas máximas dentro de 3 a 4 horas ³⁰. A vareniclina é amplamente distribuída nos tecidos e seu volume médio de distribuição aparente é de 415 litros, expressando coeficiente de variação de 50%, conforme estudo populacional ³¹; possui baixa ligação com proteínas plasmáticas, segundo ensaios realizados *in vitro*, e sua fração (100 ng/mL) não ligada a proteínas plasmáticas foi de 79,7% ³².

As rotas metabólicas da vareniclina, até então identificadas, são a N-carbomoil glicoronidação, a N-formilação, a conjugação com uma hexose e a oxidação. Os metabólitos excretados na urina são hidroxivareniclina e vareniclina N-carbomoilglucuronideo, representando menos do que 10% da dose administrada. Acredita-se que nenhum dos metabólitos da vareniclina seja farmacologicamente ativo, pois são encontrados em concentração consideravelmente baixa; e a conformação de suas estruturas químicas não permite que estes apresentem atividade significativa para os receptores nAChR (subunidades $\alpha 4\beta 2$) ^{33, 34}.

A metabolização da vareniclina provavelmente não é catalizada pelas enzimas do complexo Citocromo P450. Ensaio realizado com microsossoma hepático humano mostraram que a formação do conjugado vareniclina N-carbomoilglucoronídeo, o metabólito mais abundante encontrado na urina, foi catalisada pela isoenzima UGT2B7

A média do tempo de meia vida da vareniclina é de 24 horas, independentemente da dose administrada, sendo excretada, em sua maior parte, na forma inalterada (cerca de 90%). A eliminação renal da vareniclina exhibe cinética linear e a sua excreção ocorre pela filtração glomerular, na qual está associada à secreção tubular realizada pelo transportador catiônico orgânico OCT2. O *clearance* estimado da vareniclina é de 88 a 155 mL/min, após a administração de uma única dose, e de 92 a 143 mL/min, após doses repetidas. A depuração de vareniclina é reduzida na presença de doença renal ^{35, 36}.

1.3.2 Bupropiona

1.3.2.1 Farmacodinâmica

A bupropiona foi desenvolvida para atuar como um antidepressivo; no entanto, durante a prática clínica, percebeu-se o seu potencial em diminuir o desejo de fumar; atua como um inibidor relativamente seletivo da recaptação de norepinefrina e dopamina, com pequeno efeito na recaptação de serotonina. A bupropiona é também um antagonista não competitivo de diversos nAChR ³⁷.

O mecanismo pelo qual a bupropiona aumenta a capacidade dos pacientes em abster-se do ato de fumar ainda é desconhecido. Sugere-se que o mecanismo seja mediado por meios noradrenérgicos e/ou dopaminérgicos, minimizando os sintomas da abstinência nicotínica ³⁸. A maioria dos eventos adversos relatados com a bupropiona, quando utilizada para cessação do tabagismo, é constituída por insônia (30-40% dos pacientes) e boca seca (10% dos pacientes) ³⁹.

1.3.2.2 Farmacocinética

A bupropiona é metabolizada primariamente em diversos metabólitos ativos, como a hidroxibupropiona, a treoidrobupropiona e a eritroidrobupropiona. A CYP2B6 é a principal isoenzima que converte a bupropiona em hidroxibupropiona em humanos; no entanto, a formação de treoidrobupropiona e a eritroidrobupropiona, que ocorre através de reação redutiva, não é mediada pela CYP2B6^{40, 41}. A eritroidrobupropiona não pode ser mensurada no plasma após a administração de uma única dose de bupropiona. Os metabólitos ativos são posteriormente metabolizados em inativos e são excretados na urina⁴². A bupropiona e seus metabólitos assumem cinética linear após a administração crônica de doses de 150 a 300 mg/dia. A eliminação da bupropiona ocorre principalmente através da urina (87%) e das fezes (10%), de acordo com um estudo realizado em humanos na administração de bupropiona marcada com [C^{14}]. A fração da dose oral de bupropiona excretada em sua forma inalterada foi de 0,5%, o que condiz com o extenso metabolismo do fármaco, sendo que quantidades menores do que 10% desta dose foram encontradas na forma de metabólito ativo⁴². A meia vida de eliminação da bupropiona é cerca de 20 horas e o *clearance* médio aparente corresponde a aproximadamente 200L/h⁴².

1.4 Farmacogenética

A variabilidade interindividual em resposta a fármacos antitabagismo sugere que os tratamentos podem ser mais efetivos em subgrupos de fumantes⁴³⁻⁴⁵. Neste contexto, o entendimento dos fatores genéticos que estão envolvidos no processo de dependência à nicotina (DN) e no processo de cessação tabágica é requerido para a otimização do tratamento. Estudos mostraram que fatores genéticos contribuem em aproximadamente

50% na variação do sucesso na cessação tabágica ^{43, 46}. Além disso, estes fatores são bem menos conhecidos do que os fatores genéticos que influenciam a DN ⁴⁶⁻⁴⁹.

A farmacogenética é um campo da farmacologia que identifica o efeito da variação genética sobre o metabolismo, a eficácia e a toxicidade de fármacos sobre os indivíduos. O objetivo da medicina personalizada, como a farmacogenética, consiste na combinação da informação genética com outros fatores individuais para adequar as estratégias preventivas e terapêuticas, a fim de melhorar a eficácia e identificar efeitos adversos em menor frequência. Alguns estudos mostraram a associação de polimorfismos nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2* com a iniciação tabágica, DN, bem como com a cessação tabágica em resposta ao tratamento com vareniclina ^{29, 47, 50-60}. Os genes *CHRNA4* e *CHRNA2* codificam as subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$, as quais são umas das mais abundantes subunidades dos nAChR presentes no SNC e alvos específicos de ação da vareniclina ^{28, 61}. As subunidades $\alpha 4$ e $\beta 2$ são importantes alvos de ação da nicotina, pois os nAChR ($\alpha 4\beta 2$) são necessários e suficientes para a recompensa à nicotina, a tolerância e a sensibilização ⁶¹⁻⁶³.

Outros estudos farmacogenéticos evidenciaram a associação de polimorfismos presentes nos genes *CYP2B6* e *ANKK1* com a resposta à bupropiona ^{26, 64-66}. O primeiro gene codifica a principal isoenzima metabolizadora da bupropiona, a CYP2B6, como já citada; sabe-se que alguns polimorfismos funcionais presentes na *CYP2B6* podem influenciar a taxa de metabolização (lenta ou rápida) da bupropiona e de outros fármacos metabolizados pela mesma isoenzima, como efavirens, nevirapina e ciclofosfamida, por exemplo ⁶⁷⁻⁷². O outro gene, o *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*), codifica uma proteína na qual a estrutura predita inclui um domínio serina/treonina, tirosina e 11 domínios repetidos de anquirina, usualmente envolvidos em interações proteína-proteína em vias de transdução de sinal. O gene

ANKK1 é localizado próximo ao gene *DRD2*, o qual codifica o receptor de dopamina do tipo 2 ⁷³⁻⁷⁵. Sugere-se que um polimorfismo conhecido como *ANKK1* (Taq1A) pode estar envolvido no processo de DN, bem como na resposta à bupropiona, de alguma forma, seja por estar em desequilíbrio de ligação com algum polimorfismo funcional no gene *DRD2*, por talvez, estar localizado em uma região regulatória do gene *DRD2*, ou, ainda, por estar envolvido em processos dopaminérgicos via transdução de sinal ou outra resposta celular ⁷⁵.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a elevada prevalência de doenças relacionadas ao tabaco e a dificuldade dos indivíduos fumantes em abster-se do fumo, estudos que apontem uma terapêutica farmacológica mais efetiva podem contribuir enormemente na cessação tabágica.

Alguns testes farmacogenéticos já se encontram disponíveis aos pacientes e profissionais de saúde e, cada vez mais, as agências regulamentadoras observam os avanços tecnológicos e o entendimento da relação fármaco-genômica. Nos últimos anos, estudos geraram evidências da estreita relação genótipo-fenótipo, as quais implicarão na maior utilização de ensaios farmacogenéticos, a fim de selecionar uma terapêutica individualizada e a sua dose estimada, acarretando, assim, na melhora do paciente e na ótima relação custo-benefício ao sistema de saúde.

Neste contexto, os resultados desse trabalho poderão evidenciar associações entre os marcadores estudados e as condições de terapêutica efetiva para pacientes tratados com os fármacos antitabagismo. Estas informações poderão ser úteis na elaboração de programas preventivos e terapêuticos de medicina personalizada no sistema público de saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Para os pacientes tratados com vareniclina

Avaliar o efeito dos polimorfismos nos genes *CHRNA4* (rs1044396, rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660, rs2072661) com a resposta à vareniclina.

3.2 Para os pacientes tratados com bupropiona

Avaliar o efeito dos polimorfismos nos genes *CYP2B6*4* (rs2279343), *CYP2B6*5* (rs3211371), *CYP2B6*9* (rs3745274), *CYP2B6*6* (rs3745274 + rs2279343) e *ANKK1 Taq1A* (rs1800497) com a resposta à bupropiona.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Este estudo de coorte envolveu 483 pacientes fumantes provenientes do Programa de Assistência ao Fumante (PAF) do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 2007 a setembro de 2013. Os dados dos pacientes que obtiveram desfecho no tratamento antitabagismo foram observados no banco de dados do PAF.

O tratamento farmacológico foi constituído de uma consulta médica inicial e, distribuídas ao longo de 12 semanas, uma média de 4 consultas médicas de seguimento. Para os pacientes que não compareceram nas consultas médicas programadas, o seguimento foi realizado através de ligações telefônicas. Foram coletados, em todas as consultas médicas, os dados clínicos dos pacientes e a concentração de monóxido de carbono exalado. Dados demográficos, socioeconômicos e clínicos foram questionados. Os pacientes foram aconselhados e tratados farmacologicamente por médicos especializados no processo de cessação tabágica. Bupropiona, em monoterapia ou coadministrada com TRN, foi prescrita para os pacientes que fumavam menos de 1 maço de cigarro por dia. Vareniclina foi prescrita para os pacientes que fumavam 1 ou mais maços de cigarros por dia, ou para os pacientes que foram resistentes ou recaíram em tentativas prévias de cessação tabágica durante o tratamento com bupropiona ou adicionada de TRN. Nossa indicação para iniciar a coadministração de bupropiona com vareniclina foi para os pacientes que não alcançaram abstinência completa após 2 ou 3 meses do início da terapêutica com vareniclina, ou alcançaram abstinência completa, mas apresentaram moderados ou intensos sintomas de abstinência com o uso da vareniclina em monoterapia. A taxa de abstinência contínua (AC) foi investigada após 6

meses do início da farmacoterapia. Os desfechos dos tratamentos foram divididos em grupos: grupo sucesso (pacientes que completaram 6 meses de AC confirmada pela concentração de monóxido de carbono exalado); grupo recaída (pacientes que não completaram 6 meses de AC) e grupo resistente (pacientes que nunca alcançaram AC após o início do tratamento medicamentoso) ^{76, 77}. A Figura 1 mostra o desenho do estudo.

Figura 1 - Desenho do estudo. TRN= terapia de reposição nicotínica. AC= abstinência contínua. Grupo Sucesso= pacientes que completaram 6 meses de AC; Grupo Recaída= pacientes que não completaram 6 meses de AC; Grupo Resistente= pacientes que nunca alcançaram AC após o início do tratamento medicamentoso.

4.2 Comitê de ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (nº 0022/11), todos os pacientes foram informados do estudo e incluídos quando consentiram em participar, assinando, assim, o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo).

4.3 Escores de dependência à nicotina

Foram realizados o teste de Fagerström para dependência à nicotina (FTND) e o escore de consumo situacional Issa (escore Issa). O FTND, uma versão revisada do questionário de tolerância de Fagerström, é compreendido por seis questões, com diferentes pesos para cada questão, gerando um escore que varia de 0 a 10 pontos e o

agrupamento dos indivíduos em 5 categorias: 1-2 pontos = muito baixa dependência; 3-4 pontos = baixa dependência; 5 pontos = dependência moderada; 6-7 pontos = alta dependência; e 8-10 pontos = muito alta dependência ⁷⁸.

O FTND é utilizado em muitos países como um método barato, fácil de ser aplicado e não invasivo para determinar a DN ⁷⁸ (versão em português no Apêndice 1). O escore Issa é compreendido por quatro questões, com peso de um ponto para cada resposta afirmativa, gerando a pontuação final que varia de 0 a 4 pontos. Este escore é baseado nos efeitos psicoativos da nicotina nos processos de cognição, atenção, concentração, humor, bem-estar e prazer ⁷⁹ (Apêndice 2). Esse escore é utilizado pelo PAF com o objetivo de reclassificar, como moderados ou altamente dependentes, os pacientes que obtiveram o escore de FTND abaixo de 5, mas que, no entanto, possuem nível de DN considerável em relação aos efeitos psicoativos da nicotina. São reclassificados os pacientes que obtiverem escore Issa ≥ 3 .

4.4 Amostras biológicas

Foram coletados 20 mL de sangue, de cada indivíduo, por punção venosa em jejum; para isto, foram utilizados tubos a vácuo BD Vacutainer System[®] com anticoagulante K₃EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA).

4.5 Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico, através do método de precipitação salina, segundo o protocolo descrito.

Oito mL de sangue foram transferidos para um tubo de 50 mL, foi adicionado tampão A (1mM NH₄HCO₃, 144mM NH₄Cl), completando-se o volume final para 30 mL. A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e armazenada a 4°C por 10

minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido ao mesmo procedimento descrito acima. O sedimento leucocitário foi finalmente ressuspensão em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA pH 8), 200 µL de SDS 10%, 500 µL de tampão C (50 µL de SDS 10%, 2µL de Na₂EDTA 0,5 M pH 8, 488 mL de água destilada) com proteinase K (2 µL de proteinase K 20 mg/mL diluída em 5 mL de tampão C) e mantido a 37°C por aproximadamente 12-18 horas. Após esse processo, adicionou-se 1 mL de solução D (6 M NaCl), a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugada a 4°C por 20 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 mL e a ele foram adicionados 10 mL de etanol absoluto gelado. Com uma leve agitação, já pôde ser notada a precipitação do DNA, que foi retirado cuidadosamente e transferido para um criotubo de 1,5 mL de capacidade contendo 1 mL de etanol 70% gelado. O criotubo foi então centrifugado a 4°C por 15 minutos a 13.500 rpm; o etanol foi descartado e o sedimento (DNA) foi mantido à temperatura ambiente até a evaporação do etanol remanescente. Em seguida, este *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Após a completa ressuspensão do *pellet*, diluíram-se 20 µL do material em 980 µL de TE e a determinação da concentração do DNA foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. A concentração final foi corrigida para 100 ng/µL, no tubo de estoque, e para 10 ng/µL, no tubo de uso.

4.6 Padronização das genotipagens

4.6.1 Descrição dos polimorfismos e das metodologias de genotipagem adotadas

O Quadro 1 mostra a descrição dos polimorfismos estudados. A metodologia preferencialmente escolhida para a genotipagem dos polimorfismos foi amplificação do DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), seguida pela análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*). No entanto, os polimorfismos pertencentes ao gene *CYP2B6* não apresentaram padrões de decaimento confiáveis para discriminação alélica por HRM, provavelmente devido à grande quantidade de polimorfismos vizinhos presentes neste gene; portanto, estes polimorfismos foram genotipados pela metodologia de restrição enzimática (RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*).

Quadro 1 - Relação dos fármacos, genes e polimorfismos analisados

Fármaco	Gene	rs	Base nucleotídica	Menor alelo	Função	Variante enzimática	Metodologia de genotipagem
Vareniclina	<i>CHRNA4</i>	rs1044396	c.C1629T	T	p.Ser543Ser		HRM
	<i>CHRNA4</i>	rs2236196	c.G534A	G	UTR 3'		HRM
	<i>CHRNA2</i>	rs2272660	c.T313C	T	UTR 3'		HRM
	<i>CHRNA2</i>	rs2272661	c.G472A	A	UTR 3'		HRM
Bupropiona	<i>ANKK1</i>	rs1800497	c.G2137A (Taq1A)	A	p.Glu713Lys		HRM
	<i>CYP2B6</i>	rs3745274	c.G516T	T	p.Gln172His	<i>CYP2B6</i> *9	RFLP
	<i>CYP2B6</i>	rs2279343	c.A785G	G	p.Lys262Arg	<i>CYP2B6</i> *4	RFLP
	<i>CYP2B6</i>	rs3211371	c.C1459T	T	p.Arg487Cys	<i>CYP2B6</i> *5	RFLP

*CYP2B6**5, *CYP2B6**6 e *CYP2B6**9 = variantes preditoras de fenótipo de metabolização lenta; *CYP2B6**4 = variante preditora de metabolização rápida; *CYP2B6**6 = variante formada pela presença dos polimorfismos rs3745274 e rs2279343 em um mesmo indivíduo. Menor alelo = alelo de menor frequência encontrado na nossa casuística, em pacientes brasileiros provenientes do Programa de Assistência ao Fumante (PAF). HRM = análise da curva de melting - *high resolution melting*. RFLP = restrição enzimática - *restriction fragment length polymorphism*.

4.6.2 Desenho e seleção dos *primers*

Os *primers* (ou iniciadores) para os polimorfismos genotipados pela metodologia de HRM (*CHRNA4*: rs1044396 e rs2236196; *CHRNA2*: rs2072660 e rs2072661 e *ANKK1*: rs1800497) foram desenhados utilizando o programa disponível na internet *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). O Quadro 2 mostra a descrição dos *primers* desenhados.

Os *primers* para os polimorfismos *CYP2B6* (rs3745174, rs2279343, rs3211371) foram selecionados a partir artigo de Lang *et al* ⁸⁰, os quais realizaram a genotipagem desses polimorfismos pela metodologia de RFLP; os *primers* selecionados estão descritos no Quadro 3.

Quadro 2 - Descrição dos *primers* desenhados pelo software *Primer 3* para genotipagem por HRM

Polimorfismos	Primer F	Primer R
<i>CHRNA4</i> (rs1044396)	AGCCCTCTCCGTGCAAAT	CTTTGGTGCTGCGGGTCT
<i>CHRNA4</i> (rs2236196)	ACCCTCTCCTAGCGAAGCAG	CAGGGTCCTTGAGCCTCTC
<i>CHRNA2</i> (rs2072660)	AGCAAGGCTGCTAAGTGGAA	GACAATCCTGTCCCCTTCCT
<i>CHRNA2</i> (rs2072661)	CTGGCCTGACACAATGGTAG	GCTGCTGTCCACTCAAGCA
<i>ANKK1</i> (rs1800497)	GGTGTGCAGCTCACTCCAT	ACAGCCATCCTCAAAGTGCT

Quadro 3 - Descrição dos *primers* selecionados do artigo (Lang *et al* ⁸⁰) para genotipagem por RFLP

Polimorfismos	Primer F	Primer R
<i>CYP2B6</i> rs3745274	GGTCTGCCCATCTATAAAC	CTGATTCTTCACATGTCTGCG
<i>CYP2B6</i> rs2279343	GACAGAAGGATGAGGGAGGAA	CTCCCTCTGTCTTTCAATTCTGT
<i>CYP2B6</i> rs3211371	TGAGAATCAGTGGAAGCCATAGA	TAATTTTCGATAATCTCACTCCTGC

4.6.3 Gradiente de temperatura dos *primers*

Primeiramente, os *primers* liofilizados foram ressuspensos em 500µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1, mM EDTA pH 8), homogeneizados e mantidos em repouso por 24 horas; após, foi retirada uma alíquota para uso com concentração final da para 5

pmol/ μ L de *primer*. Depois, foi realizada uma reação de PCR gradiente, a qual permitiu determinar a melhor temperatura de anelamento para cada par de *primer* trabalhado. A PCR gradiente foi realizada tanto para os *primers* que foram utilizados para a genotipagem por HRM, quanto para os utilizados para a genotipagem por RFLP. A reação foi constituída de 0,4 μ L de DNA genômico (20 ng), 2 μ L de tampão (2mM $MgCl_2$, 200mM dNTPs), 0,4 μ L de cada *primer* (200 nM), 0,5 U de *BioTaq Polimerase* DNA (Bio-Química, Brasil) e água Mili-Q autoclavada completando o volume final para 10 μ L. Foi realizada uma PCR gradiente com 35 ciclos nas seguintes condições: desnaturação do DNA molde em 94°C por 120 s no primeiro ciclo, desnaturação em 94°C por 30 s, anelamento de 40°C a 65°C (em uma escala de 12 temperaturas) por 30 s, extensão de 72°C por 120 s. Foram realizadas 12 reações, uma para cada temperatura de anelamento testada; a amplificação foi confirmada em gel de agarose a 2%. Conforme a qualidade das bandas de DNA no gel de agarose, foi definida a temperatura de melhor anelamento dos *primers*.

4.7 Genotipagem

4.7.1 Genotipagem pela metodologia de HRM

As análises dos genótipos para os polimorfismos nos genes *CHRNA4*, *CHRNA2* e *ANKK1* (Quadro 1) foram realizadas por HRM com a utilização dos *primers* descritos no Quadro 2. Neste procedimento, as reações foram otimizadas no aparelho *Rotor Gene 6000*[®] (*Qiagen, Courtaboeuf, FR*) utilizando o reagente fluorescente DNA-intercalante *SYTO9*[®] (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). A reação foi constituída por 1 μ L (10ng) de DNA genômico, 2 μ L de tampão (2 mM $MgCl_2$, 200mM dNTPs 200mM), 0,4 μ L de cada *primer* (200 nM), 0,6 μ L de *SYTO9*[®] (1,5 mM), 0,5 U de *BioTaq Polimerase* DNA (Bio-Química, BR) e água Mili-Q autoclavada completando para o volume final de 10

μL. Uma PCR de 40 ciclos foi realizada nas seguintes condições: desnaturação do DNA molde em 94°C por 120 s no primeiro ciclo, desnaturação em 94°C por 20 s, anelamento de 59,6°C para o rs1044396, 56,7°C para o rs2236196, rs2072660 e rs2072661, e 61,8°C para o rs1800497 por 20 s, e extensão de 72°C por 22 s. Na fase de HRM, o aparelho Rotor Gene 6000® mensurou a fluorescência em cada aumento de temperatura (0,1°C/s numa faixa de 70-88°C). Foram geradas curvas de *melting* pelo declínio da fluorescência com o aumento da temperatura; e, em uma análise, as trocas nucleotídicas resultaram em três diferentes padrões de curvas (Figuras 2 a 6). Três amostras de cada padrão de curva foram analisadas utilizando o sequenciamento bidirecional para o conhecimento dos genótipos (ABI Terminator Sequencing Kit® e ABI 3500XL Sequencer® - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ⁸¹. Os dois métodos geraram resultados idênticos em todos os testes. Os genótipos selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado foram facilmente discriminados pela análise de HRM. Além disso, 6% das amostras foram selecionadas aleatoriamente, como controle de qualidade, gerando resultados idênticos.

Figura 2 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396). Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = CC; 2 = CT; 3 =TT.

Figura 3 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA4* (rs2236196). Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = GG; 2 = GA; 3 = AA.

Figura 4 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA2* (rs2072660). Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = TT; 2 = CT; 3 = CC.

Figura 5 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA2* (rs2072661). Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = GG; 2 = GA; 3 = AA.

Figura 6 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *ANKK1* (rs1800497). Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = AA; 2 = AG; 3 = GG.

4.7.2 Genotipagem pela metodologia de RFLP

Os polimorfismos pertencentes ao gene *CYP2B6* (rs3745274, rs2279343 e rs3211371) foram genotipados pela metodologia de RFLP; para este procedimento, foram utilizados os *primers* descritos no Quadro 3.

Foi realizada uma PCR tradicional, com maior volume final, constituída por 3,4 µL (34 ng) de DNA genômico, 3,4 µL de tampão (2 mM MgCl₂, 200mM dNTPs 200mM), 0,7 µL de cada *primer* (200 nM), 0,8 U de BioTaq Polimerase DNA (Bio-Química, Brasil) e água Mili-Q autoclavada completando para o volume final de 17 µL. A PCR foi realizada com 40 ciclos nas seguintes condições: desnaturação do DNA molde em 94°C por 120 s no primeiro ciclo, desnaturação em 94°C por 30 s, anelamento de 59°C para o rs3745274, 56,7°C para o rs2279343 e 59,6°C para o rs3211371 por 30 s, e extensão de 72°C por 120 s. A amplificação do DNA foi confirmada em gel de agarose 1%; *amplicons* de 526 pb para o rs3745274, 640 pb para o rs2279343 e 1401 pb para o rs3211374, foram visualizados.

Após confirmação da amplificação do DNA, para a reação de RFLP, utilizaram-se 15 µl de produto de PCR e 5 µL de mix de RFLP, esta última foi composta por água

Mili-Q autoclavada, enzima de restrição (*Bsr I* para o rs3745274, *Sty I* para o rs2279343 e *Bgl II* para o rs3211371, *New England Biolabs, UK*) e tampão (NaCl 1000mM, tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100mM, BSA 1000 µg/mL, pH 7,9). No Quadro 4, encontram-se descritas as quantidades de enzimas e reagentes utilizadas na mix de RFLP para cada polimorfismo. As reações de RFLP foram encubadas a 37°C *overnight*, para os rs2279343 e rs3211371, e a 65°C por 4 horas, para o rs3547274, conforme Quadro 4.

Quadro 4 - Enzimas, reagentes e fragmentos gerados para cada polimorfismo

Polimorfismos do gene <i>CYP2B6</i>	Enzimas	Fragmentos	Encubação
rs3745274	<i>Bsr I</i> 0,3 µL (2 U)	Selvagem 268, 241 e 17 Heterozigoto 509, 268, 241 e 17 Homozigoto mutado 509 e 17	65°C em forno por 4 horas
rs2279343	* <i>Sty I</i> 1 µL (10 U)	Selvagem 297, 171, 116 e 56 Heterozigoto 297, 171, 116 e 56 Homozigoto mutado 116 e 56	37° C em estufa <i>Overnight</i>
rs3211371	<i>Bgl II</i> 1 µL (10 U)	Selvagem 1401 Heterozigoto 1401, 1185 e 216 Homozigoto mutado 1185 e 216	37°C em estufa <i>Overnight</i>

Composição e volume de tampão = NaCl 1000mM, tris- HCl 500 mM, MgCl₂ 100mM, BSA 1000 µg/mL, pH 7,9; 2,3 µL para o rs3745274, 1,5 µL para o rs2279343 e 2 µL para o rs3211371. Volume de água Mili-Q autoclavada= 2,4 µL, 2,35 µL, e 2 µL, respectivamente para cada polimorfismo. *BSA = Albumina de soro bovino - *Bovine Serum Albumin*, 0,15 µL para o rs2279343. Concentração de Agarose em gel: 3% para o rs3745274; 4% para o rs2279343 e 1% para o rs3211371.

Após o período de encubação, 15µL do produto pós-RFLP foram submetidos à eletroforese (500mA, 80V, 120W, por 2 horas) em gel de agarose, utilizando-se as seguintes concentrações de agarose para cada polimorfismo: agarose a 3% para o

polimorfismo rs3745274; agarose a 4% para o rs2279343; e agarose a 1% para o rs3211371. Após a “revelação” do gel de agarose em fotodocumentadora, os três genótipos (selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado) foram facilmente discriminados (Figuras 8, 10 e 12). As reações de RFLP geraram os seguintes fragmentos: para o rs3745274 (genótipo selvagem [GG] = 268, 241 e 17 pb; heterozigoto [GT] = 509, 268, 241 e 17 pb e homozigoto mutado [TT] = 509 e 17pb, sendo que o fragmento de 17 pb não foi visualizado no gel de agarose); para o rs2279343 (genótipo selvagem [AA] = 297, 171, 116 e 56 pb; heterozigoto [AG] = 297, 171, 116 e 56 pb e homozigoto mutado [GG] = 116 e 56 pb, sendo que o fragmento de 56 pb não foi visualizado no gel de agarose) e para o rs3211371 (genótipo selvagem [CC] = 1401 pb; heterozigoto [CT] = 1401, 1185, 216 pb e homozigoto mutado [TT] = 1185 e 216 pb, sendo que o fragmento de 216 pb não foi visualizado no gel de agarose), conforme Figuras 7 a 12.

Figura 7 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo *CYP2B6* (rs3745274). O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 526 pb.

Figura 8 - Eletroforese em gel 3% após reação RFLP com enzima *Bsr I* para o polimorfismo *CYP2B6* (3745274). 1 = selvagem (GG); 2 = heterozigoto (GT); 3 = homozigoto mutado (TT). O fragmento de 17 pb não foi visualizado no gel de agarose. O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 526 pb.

Selvagem	Homozigoto Mutado	Heterozigoto
	468 pb	468 pb
297 pb		297 pb
171 pb		171 pb
116 pb	116 pb	116 pb
56 pb	56 pb	56 pb

Figura 9 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343). O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 640 pb.

Figura 10 - Eletroforese em gel 4% após reação RFLP com enzima *Sty I* para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343). 1 = selvagem (AA); 2 = heterozigoto (AG); 3 = homozigoto mutado (GG). O fragmento de 56 pb não foi visualizado no gel de agarose. O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 640 pb.

Figura 11 - Figura didática da discriminação entre os genótipos para o polimorfismo *CYP2B6* (3211371). Tamanho do *amplicon*: 1401 pb. O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 1.401 pb.

Figura 12 - Eletroforese em gel 1% após reação RFLP com enzima *Bgl II* para o polimorfismo *CYP2B6* (3211371). 1 = selvagem (CC); 2 = heterozigoto (CT); 3 = homozigoto mutado (TT). O fragmento de 216 pb não foi visualizado no gel de agarose. O tamanho do *amplicon* antes do processo de RFLP era de 1401 pb.

4.8 Análises estatísticas

As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão e as variáveis categóricas como frequências. Foi realizado o teste Qui-quadrado para as análises comparativas de variáveis categóricas (características gerais, desfecho do tratamento e escores de DN categorizados), de acordo com os polimorfismos nos genes *CHRNA4*, *CHRNA2*, *CYP2B6* e *ANKK1*. O teste de *Student* foi utilizado para comparar as características gerais e o FTND, de acordo com os polimorfismos. Foram utilizados modelos de regressão logística univariado e multivariado para avaliar a taxa de risco para o sucesso – *odds ratio* (OR) – na cessação tabágica. Modelos dominante e

recessivo foram utilizados para o rs1044396 (CC vs CT+TT) e para o rs2236196 (AA+AG vs GG), baseados em achados de estudos anteriores para estes polimorfismos no gene *CHRNA4*, respectivamente ^{55, 82, 83}; modelos aditivos foram realizados para os polimorfismos *CHRNA2* (rs2072660 e rs2072660), baseados nos achados de estudos prévios ^{29, 58, 59}. Para os polimorfismos presentes no gene *CYP2B6*, foi utilizado o modelo dominante para a presença do alelo polimórfico, para cada uma das variantes enzimáticas, sendo elas a *CYP2B6*4* (presença do alelo G para o rs2279343), a *CYP2B6*5* (presença do alelo T para o rs3211371), a *CYP2B6*6* (presença do alelo G para o rs2279343 e presença do alelo T para o rs3745274) e a *CYP2B6*9* (presença do alelo T para o rs3745274), conforme estudos anteriores, como o de Zhang *et al* ⁸⁴. Para o polimorfismo *ANKKI* (rs1800497), foi adotado o modelo dominante (GG vs GA+AA) baseado em achados de estudos prévios ^{26, 85}. Modelos de regressão linear foram realizados para avaliar a influência dos polimorfismos no escore de FTND em presença de covariáveis. Foram conduzidas análises de desequilíbrio de ligação, de equilíbrio de Hardy-Weinberg e análise de haplótipos através do *software Haploview* 4.0. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software SPSS* (v.16.0), com o nível de significância de $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais e clínicas dos pacientes

A Tabela 1 mostra as características gerais e clínicas do grupo total dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo.

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo (n=483)

Idade (anos)	54 ± 19
Gênero, mulheres (%)	63,3
Etnia autodeclarada, brancos (%)	69,3
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 5
Escolaridade, nível superior (%)	34,1
FTND	6,8 ± 2,5
FTND, ≥ 6 (%)	74,4
Escore Issa, ≥ 3	66,7
Hipertensão (%)	41,0
Doença arterial coronariana (%)	15,9
Infarto agudo do miocárdio (%)	18,0
Dislipidemia (%)	38,9
Diabetes melito tipo 2 (%)	11,7
Obesidade (%)	5,6
Depressão (%)	20,1
Ansiedade (%)	19,3
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	15,1
Asma (%)	2,1
Número de doenças diagnosticadas	2,4 ± 1,7

FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=483). Escore Issa = escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=84).

Devido a não amplificação de algumas amostras durante a genotipagem, o tamanho amostral (n=483) foi reduzido em relação aos rs2279343 e rs3211371 do gene *CYP2B6* (n=478; n=469), respectivamente.

Quanto às frequências dos polimorfismos presentes no gene *CHRNA4*, a frequência do alelo T para o polimorfismo rs1044396 foi de 44,1% e a distribuição dos genótipos foi de 21,7% (n=105) para TT, 44,7% (n=216) para CT e 33,5% (n=162) para CC. A frequência do alelo G para o polimorfismo rs2236196 foi de 36,8% e a

distribuição dos genótipos foi de 14,7% (n=71) para GG, 44,3% (n=214) para GA e 41,0% (n=198) para AA.

Quanto às frequências dos polimorfismos no gene *CHRNA2*, a frequência do alelo T para o polimorfismo rs2072660 foi de 28,7% e a distribuição dos genótipos foi de 7,9% (n=38) para TT, 41,6% (n=201) para TC e 50,5% (n=244) para CC. Quanto à frequência do rs2072661, a frequência do alelo A foi de 26,7% e a distribuição dos genótipos foi de 6,6% (n=32) para AA, 40,2% (n=194) para AG e 53,2% (n=257) para GG.

Quanto às frequências dos polimorfismos no gene *CYP2B6*, a frequência do alelo T para o polimorfismo rs3745274 foi de 29,6% e a distribuição dos genótipos foi de 8,7% (n=42) para TT, 41,8% (n=202) para TG e 49,5% (n=239) para GG. Quanto à frequência do rs2279343, a frequência do alelo G foi de 28,2% e a distribuição dos genótipos foi de 8,6% (n=41) para GG, 39,3% (n=188) para GA e 52,1% (n=249) para AA. Quanto à frequência do rs3211371, a frequência do alelo T foi de 8,2% e a distribuição dos genótipos foi de 1,7% (n=8) para TT, 13,0% (n=61) para TC e 85,3% (n=400) para CC.

Quanto à frequência do polimorfismo rs1800497 no gene *ANKK1*, a frequência do alelo A foi de 24,7% e a distribuição dos genótipos foi de 5,8% (n=28) para AA, 37,9% (n=183) para AG e 56,34% (n=272) para GG.

A distribuição genotípica para os polimorfismos rs1044396, rs2236196, rs2072660, rs2072661, rs3745274, rs2279343 e rs1800497 estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) ($X^2=3,18$; $P=0,05$; $X^2=1,12$; $P=0,29$; $X^2=0,15$; $P=0,70$; $X^2=0,32$; $P=0,57$; $X^2=0,0054$; $P=0,94$ e $X^2=0,42$; $P=0,52$; $X^2=0,15$; $P=0,70$; respectivamente), exceto a distribuição genotípica do polimorfismo rs3211371 ($X^2=8,80$; $P=0,0030$). A análise de desequilíbrio de ligação mostrou que os

polimorfismos rs1044396 e rs2236196 no gene *CHRNA4* e os polimorfismos rs2072660 e rs2072661 no gene *CHRNA2* estavam em forte desequilíbrio de ligação (LD=96 e LD=89, respectivamente, n=483). Já para os polimorfismos estudados no gene *CYP2B6*, a análise de desequilíbrio de ligação mostrou que os polimorfismos não estavam em forte desequilíbrio de ligação (Figura 13).

Figura 13 - Análise de desequilíbrio de ligação e frequência de haplótipos para os polimorfismos nos genes *CHRNA4*, *CHRNA2* (n=483) e *CYP2B6* (n=478) nos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo.

5.2 Análises dos polimorfismos nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2*

5.2.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396)

As Tabelas 2 e 3 mostram as características gerais e clínicas, de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396), do grupo total de pacientes e dos pacientes tratados com vareniclina, respectivamente. Neste trabalho, foram mostradas as

características gerais entre os genótipos do polimorfismo rs1044396, pois, dos polimorfismos presentes nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2*, somente este apresentou achados significantes para a resposta na cessação tabágica. Contudo, foram inseridas as análises de resposta à cessação tabágica de todos os outros polimorfismos estudados. Não foram encontradas diferenças significativas nos dados demográficos e clínicos dos pacientes, de acordo com o grupo total ou o grupo tratado com vareniclina.

Tabela 2 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396)

	CC (n=162)	CT or TT (n=321)	P valor
Idade (anos)	52 ± 10	54 ± 23	0,27
Gênero, mulheres (%)	58,9	51,4	0,09
Etnia autodeclarada, brancos (%)	59,9	64,0	0,10
Escolaridade, nível superior (%)	27,2	27,4	0,55
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 5	26 ± 5	0,06
FTND	6,9 ± 2,4	6,7 ± 2,5	0,66
FTND, ≥ 6 (%)	67,9	71,1	0,39
Escore Issa, ≥ 3	79,3	70,4	0,38
Hipertensão (%)	42,6	40,2	0,61
Doença arterial coronariana (%)	13,0	17,4	0,20
Infarto agudo do miocárdio	16,0	19,0	0,43
Dislipidemia (%)	43,8	36,4	0,12
Diabetes melito tipo 2 (%)	17,9	17,1	0,53
Obesidade (%)	5,6	5,6	0,98
Depressão (%)	19,1	20,6	0,71
Ansiedade (%)	20,4	18,7	0,66
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	11,7	16,8	0,14
Asma (%)	2,5	1,9	0,66
Número de doenças diagnosticadas	2,3 ± 1,6	2,5 ± 1,7	0,43

FTND = Teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=483). Escore Issa = escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=84).

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes tratados com vareniclina, de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396)

	CC (n=61)	CT ou TT (n=106)	P valor
Idade (anos)	52 ± 9	52 ± 11	0,84
Gênero, mulheres (%)	57,3	55,7	0,41
Etnia autodeclarada, brancos (%)	72,7	89,4	0,01
Escolaridade, nível superior (%)	32,8	34,9	0,78
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 4	27 ± 5	0,46
FTND	7,2 ± 2,7	6,8 ± 2,6	0,45
FTND ≥ 6 (%)	73,8	74,7	0,83
Hipertensão (%)	31,1	26,4	0,51
Doença arterial coronariana (%)	8,2	10,4	0,65
Infarto agudo do miocárdio (%)	9,8	12,3	0,63
Dislipidemia (%)	23,0	26,4	0,62
Diabetes melito tipo 2 (%)	13,0	17,9	0,10
Obesidade (%)	0,0	3,8	0,13
Depressão (%)	18,0	17,9	0,99
Ansiedade (%)	13,1	11,3	0,73
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	9,8	9,4	0,93
Asma (%)	1,6	1,9	0,91
Número de doenças diagnosticadas	1,9 ± 1,5	1,8 ± 1,5	0,80

FTND = Teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=167).

A Tabela 4 mostra a taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos prescritos e o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396). Os pacientes que apresentavam o genótipo CC tiveram menor taxa de sucesso no tratamento com vareniclina (29,5%), em comparação com os pacientes portadores dos genótipos CT e TT (50,9%) (P=0,007; n=167). A Figura 14 nos mostra a distribuição das taxas de sucesso, recaída e resistência, de acordo com os genótipos nos pacientes tratados com vareniclina. Diferenças significativas na taxa de sucesso na cessação tabágica foram observadas mesmo dividindo-se os grupos genotípicos (CC=29,5%; CT=51,5%; TT=50,0%; P=0,02). Não foi observada nenhuma associação em outros grupos medicamentosos (vareniclina e bupropiona ou bupropiona em monoterapia ou coadministrada com TRN).

Tabela 4 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos e o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396)

Grupo de pacientes	Taxa de sucesso (%)		P valor
	CC	CT ou TT	
Grupo Total (n=483)	37,0	46,4	0,05
Vareniclina (n=167)	29,5	50,9	0,007
Vareniclina e bupropiona (n=79)	40,0	50,0	0,41
Bupropiona e TRN (n=237)	42,1	42,2	0,98

TRN= terapia de reposição nicotínica (goma e/ou adesivo).

Figura 14 - Status dos pacientes tratados com vareniclina de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396). Quadro A: status de acordo com modelo dominante. Quadro B: status de acordo com modelo aditivo.

A Tabela 5 mostra uma análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica do grupo de pacientes tratados com vareniclina. Os genótipos CT ou TT, para o rs1044396, foram associados com maior OR para o sucesso (OR=1,67; IC 95%=1,10-2,53; P=0,02) em um modelo multivariado por gênero, idade, etnia e escore de FTND. Em uma análise univariada, os genótipos CT ou TT mostraram OR de 2,48 (IC 95%=1,27-4,84, P=0,008).

Tabela 5 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n=167) para o *CHRNA4* (rs1044396)

Variáveis	OR	IC95%	P valor
Genótipos CT ou TT para o <i>CHRNA4</i> (rs1044396)	1,67	1,10-2,53	0,02
Gênero (homem)	1,17	0,79-1,73	0,44
Idade	1,01	0,97-1,05	0,31
Etnia autodeclarada (branca)	1,07	0,70-1,61	0,77
Escore de FTND	0,96	0,89-1,05	0,38

FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence*.

Em uma análise com o grupo de pacientes autodeclarados brancos (n=133) foram observados significantes achados. Os pacientes portadores do genótipo CC obtiveram 30,0% de sucesso em resposta ao tratamento com vareniclina, enquanto os pacientes portadores dos genótipos CT ou TT tiveram 51,6% (P=0,02). Em uma análise de regressão logística multivariada, os genótipos CT ou TT foram associados com maior OR para o sucesso (OR=1,97; IC 95%=1,16-3,34; P=0,01).

5.2.2 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com os polimorfismos *CHRNA4* (rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660 e rs2072661)

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos medicamentosos quanto à taxa de sucesso na cessação tabágica entre os genótipos dos polimorfismos *CHRNA4* (rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660 e rs2072661), mesmo em um modelo multivariado.

Para o grupo de pacientes tratados com vareniclina, o OR de sucesso foi de 1,15 (IC 95%=0,61-2,17; P=0,66), para o polimorfismo *CHRNA4* (rs2236196). Os pacientes portadores dos genótipos AA, AG, ou GG apresentaram 44,2%, 46,3%, e 30,4% de sucesso durante a terapêutica com vareniclina (P=0,40), respectivamente.

Para os polimorfismos *CHRNA2* (rs207266 e rs2072661), foram encontrados OR de 1,01 (IC 95%=0,97-1,05; P=0,66) e de 1,08 (IC 95%=0,59-1,98; P=0,81) de sucesso na cessação tabágica nos pacientes tratados com vareniclina, respectivamente para os

polimorfismos. Os pacientes com os genótipos TT, TC ou CC, para o rs2072660, apresentaram 41,9%, 44,3% e 46,2% de sucesso durante a terapêutica com vareniclina ($P=0,94$), respectivamente. Os pacientes com os genótipos GG, GA ou AA, para o rs2272661, apresentaram 40,9%, 46,8%, e 41,7% de sucesso durante o tratamento com vareniclina ($P=0,76$), respectivamente.

5.2.3 Análise haplotípica nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2*

O haplótipo T-A no gene *CHRNA4* foi associado com o sucesso na cessação tabágica ($P=0,03$), enquanto nenhuma associação foi encontrada para os haplótipos C-G e C-A.

Não foi encontrada nenhuma associação com o sucesso na cessação tabágica com os haplótipos C-G, T-A, T-G e C-A no gene *CHRNA2* (P valores= 0,96; 0,56; 0,3; e 0,5, respectivamente).

5.3 Análises dos polimorfismos nos genes *CYP2B6* e *ANKK1*

5.3.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo *CYP2B64 (rs2279343)**

As Tabelas 6 e 7 mostram as características gerais e clínicas, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343), do grupo total de pacientes e dos pacientes tratados com bupropiona, respectivamente. Foram apresentadas as características gerais entre os genótipos do polimorfismo rs2279343, pois, dos polimorfismos presentes nos genes *CYP2B6* e *ANKK1*, apenas este apresentou achados significantes para a resposta na cessação tabágica. Não foram encontradas diferenças significativas nos dados demográficos e clínicos dos pacientes, de acordo com o grupo total ou o grupo tratado com bupropiona.

Tabela 6 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343)

	AA (n=249)	AG ou GG (n=229)	P valor
Idade (anos)	55 ± 25	52 ± 10	0,11
Gênero, mulheres (%)	64,1	62,4	0,70
Etnia autodeclarada, brancos (%)	28,5	33,3	0,26
Escolaridade, nível superior	31,7	36,7	0,57
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 5	26 ± 5	0,11
FTND	6,8 ± 2,4	6,8 ± 2,6	0,83
FTND, ≥ 6 (%)	73,4	75,5	0,62
Escore Issa, ≥ 3	60,0	78,6	0,24
Hipertensão (%)	41,4	41,5	0,98
Doença arterial coronariana (%)	15,3	17,0	0,60
Infarto agudo do miocárdio	18,9	17,5	0,69
Dislipidemia (%)	38,2	40,6	0,58
Diabetes melito tipo 2 (%)	10,8	13,1	0,96
Obesidade (%)	6,4	4,8	0,44
Depressão (%)	19,7	21,0	0,73
Ansiedade (%)	18,9	20,1	0,74
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	15,7	14,8	0,80
Asma (%)	2,8	1,3	0,25
Número de doenças diagnosticadas	2,4 ± 1,7	2,4 ± 1,7	0,10

FTND = Teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=478). Escore Issa = escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=67).

Tabela 7 - Características clínicas e demográficas dos pacientes tratados com bupropiona, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343)

	AA (n=127)	AG ou GG (n=110)	P valor
Idade (anos)	57 ± 24	53 ± 14	0,29
Gênero, mulheres (%)	69,3	67,3	0,74
Etnia autodeclarada, brancos (%)	43,7	44,2	0,93
Escolaridade, nível superior	24,6	21,6	0,76
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	27 ± 6	26 ± 5	0,06
FTND	6,5 ± 2,1	6,2 ± 2,6	0,38
FTND ≥ 6 (%)	69,2	66,3	0,65
Hipertensão (%)	51,2	59,1	0,22
Doença arterial coronariana (%)	22,8	22,7	0,98
Infarto agudo do miocárdio	25,2	25,5	0,96
Dislipidemia (%)	46,5	52,7	0,34
Diabetes melito tipo 2 (%)	11,0	12,7	0,86
Obesidade (%)	9,4	7,3	0,55
Depressão (%)	20,5	20,9	0,93
Ansiedade (%)	23,6	30,9	0,21
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	17,3	18,2	0,86
Asma (%)	2,4	1,8	0,77
Número de doenças diagnosticadas	2,8 ± 1,7	3,0 ± 1,6	0,42

FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=237).

A Tabela 8 mostra a taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos prescritos e o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343). Os pacientes que apresentavam o genótipo AA tiveram maior taxa de sucesso no tratamento com bupropiona (48,0%), em comparação com os pacientes portadores dos genótipos AG ou GG (35,5%) ($P=0,05$; $n=478$). Uma importante observação é que o grupo tratado com bupropiona poderia estar ou não coadministrado com TRN (goma e/ou adesivo), sendo 45 pacientes tratados somente com bupropiona; $n=105$ tratados com bupropiona e goma; $n=20$ tratados com bupropiona e adesivo e 67 pacientes tratados com goma e adesivo.

Tabela 8 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes, de acordo com os medicamentos e o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343)

Grupos de pacientes	Taxa de sucesso (%)		P valor
	AA	AG ou GG	
Grupo Total (n=478)	46,6	39,7	0,13
Vareniclina (n=167)	43,4	43,2	0,98
Vareniclina e bupropiona (n=79)	48,7	44,7	0,73
Bupropiona (n=237)	48,0	35,5	0,05

A Tabela 9 mostra uma análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica do grupo de pacientes tratados com bupropiona ($n=237$). O genótipo AA, para o rs2279343, foi associado com maior OR para o sucesso ($OR=1,92$; $IC\ 95\%=1,08-3,42$; $P=0,03$), em um modelo multivariado por gênero, idade, etnia, escore de FTND e coadministração de goma e/ou adesivo. Em uma análise univariada, o genótipo AA mostrou OR de 1,68 ($IC\ 95\%=0,98-2,83$, $P=0,05$) para o sucesso.

Tabela 9 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com bupropiona (n=237) para o *CYP2B64 (rs2279343)**

Variáveis	OR	IC 95%	P valor
Genótipos AA para o <i>CYP2B6</i> (rs2279343)	1,92	1,08-3,42	0,03
Gênero (homem)	1,81	0,96-3,40	0,07
Idade	0,98	0,95-1,01	0,17
Etnia autodeclarada (branca)	1,24	0,69-2,22	0,47
Escore de FTND	0,97	0,86-1,09	0,59
Coadministração de goma e/ou adesivo	1,04	0,51-2,15	0,91

FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence*.

5.3.2 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com os polimorfismos *CYP2B6**9 (rs3745274), *5 (rs3211371), *6 (rs3745274 + rs2279343) e *ANKK1* (rs1800497)

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos medicamentosos quanto à taxa de sucesso na cessação tabágica entre os genótipos dos polimorfismos *CYP2B6**9 (rs3745274), *5 (rs3211371), *6 (rs3745274 + rs2279343) e *ANKK1* (rs1800497), mesmo em um modelo multivariado.

Para o grupo tratado com bupropiona, os genótipos CT ou TT, para o rs3211371, e os genótipos TG ou GG, para o rs3745274, mostraram OR para o sucesso na cessação tabágica de 0,71 (IC 95%=0,29-1,72; P=0,44) e 0,62 (IC 95%=0,35-1,09; P=0,10), respectivamente, em um modelo multivariado. Os pacientes portadores dos genótipos CC, CT, TT e TT, TG, GG obtiveram 44,2%, 46,3%, 30,4% e 41,9%, 44,3% e 46,2%, respectivamente, de sucesso na cessação tabágica durante o tratamento com bupropiona (P=0,40; P=0,94). Com relação a variante *CYP2B6**6, observa-se OR de 0,64 (IC 95%=0,38-1,08; P=0,11) para o sucesso na cessação tabágica. Os pacientes, portadores de ao menos um alelo polimórfico para a variante *6, obtiveram 48% de sucesso na cessação tabágica; enquanto os pacientes portadores dos genótipos AA, para o rs3745274 + GG, para o rs2279343, obtiveram 51,1% (P=0,095) de sucesso.

Os genótipos AG ou GG para o polimorfismo *ANKK1* (rs1800497) apresentaram OR de 0,82 (IC 95%=0,46-1,48; P=0,51) para o sucesso, em um modelo multivariado. Os pacientes com os genótipos AA, AG ou GG obtiveram taxa de sucesso na cessação tabágica de 40,9%, 46,8% e 41,7%, durante o tratamento com bupropiona (P= 0,76).

5.3.3 Análise haplotípica no gene *CYP2B6*

Os haplótipos G-A-C e G-A-T para o gene *CYP2B6* foram associados com o sucesso na cessação tabágica (P=0,04 e 0,03, respectivamente). Enquanto nenhuma associação foi encontrada para os haplótipos TGC, TAC e GGC com o sucesso na cessação tabágica (P valores= 0,22; 0,29; e 0,26, respectivamente).

5.3.4 Escores de FTND e Issa, de acordo com os polimorfismos nos genes *CHRNA4*, *CHRNA2*, *CYP2B6* e *ANKK1*

Não foram observadas diferenças significativas nos escores de FTND e Issa, de acordo com o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396) ou *CYP2B6* (rs2279343), no grupo total dos pacientes (Tabela 10). Os polimorfismos estudados não apresentaram associação com escore de FTND em modelos de regressão linear (Tabela 14).

Tabela 10 - Variáveis em um modelo de regressão linear para o escore de FTND

Variáveis	Coefficiente β (erro padrão)	P valor
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CHRNA4</i> (rs1044396)	-0,04 (0,2)	0,82
Idade	0,001 (0,006)	0,86
Gênero (homem)	0,3 (0,2)	0,88
Etnia (branca)	0,1 (0,3)	0,74
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,42
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CHRNA4</i> (rs2236196)	-0,2 (0,2)	0,29
Idade	0,001 (0,006)	0,93
Gênero (homem)	0,3 (0,2)	0,90
Etnia (branca)	0,05 (0,3)	0,86
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,41

FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CHRNA2</i> (rs2072660)	0,03 (0,2)	0,89
Idade	0,001 (0,006)	0,88
Gênero (homem)	0,6 (0,3)	0,33
Etnia (branca)	0,09 (0,3)	0,76
Escolaridade	-0,1 (0,1)	0,42
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CHRNA2</i> (rs2072661)	0,1 (0,2)	0,49
Idade	0,001 (0,006)	0,84
Gênero (homem)	0,6 (0,3)	0,22
Etnia (branca)	0,07 (0,3)	0,82
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,45
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CYP2B6</i> (rs2279343)	0,04 (0,2)	0,84
Idade	0,001 (0,006)	0,87
Gênero (homem)	0,6 (0,2)	0,52
Etnia (branca)	0,1 (0,3)	0,76
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,42
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CYP2B6</i> (rs3211371)	0,5 (0,3)	0,09
Idade	0,001 (0,006)	0,86
Gênero (homem)	0,6 (0,3)	0,24
Etnia (branca)	0,07 (0,3)	0,82
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,44
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>CYP2B6</i> (rs3745274)	0,04 (0,2)	0,86
Idade	0,001 (0,006)	0,87
Gênero (homem)	0,6 (0,3)	0,25
Etnia (branca)	0,09 (0,3)	0,76
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,42
FTND		
Número de alelos variantes para o <i>ANKK1</i> (rs1800497)	-0,008 (0,2)	0,97
Idade	0,001 (0,006)	0,88
Gênero (homem)	0,6 (0,3)	0,20
Etnia (branca)	0,09 (0,3)	0,77
Escolaridade	-0,1 (0,2)	0,42

Números de alelos variantes para o polimorfismo *CHRNA* (rs10436196) foram 0, 1 ou 2 para os genótipos CC, CT, ou TT, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNA4* (rs2236196), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos AA, AG ou GG, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNA2* (rs2072660), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos TT, TC ou CC, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNA2* (rs2072661), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GA ou AA, respectivamente. Para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos AA, AG, ou GG, respectivamente. Para o polimorfismo *CYP2B6* (rs3211371), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos CC, CT ou TT, respectivamente. Para o polimorfismo *CYP2B6* (rs3745274), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GT ou TT, respectivamente. Para o polimorfismo *ANKK1* (rs1800497), foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GA ou AA, respectivamente. FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (483).

6 DISCUSSÃO

6.1 Para os resultados dos polimorfismos nos genes *CHRNA4* e *CHRNA2*

O principal resultado desse estudo, para os genes *CHRNA4* e *CHRNA2*, foi a associação do alelo T do polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396) com o aumento da taxa de sucesso na cessação tabágica, em pacientes tratados com vareniclina; no entanto, não foi encontrada nenhuma associação desse polimorfismo com os escores de FTND e Issa para DN. Não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos *CHRNA4* (rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660 e 2072662) com os fenótipos estudados. Não foram identificadas associações genéticas desses polimorfismos para os pacientes tratados com bupropiona.

Alguns estudos indicaram os genes *CHRNA4* e *CHRNA2* como fortes candidatos no entendimento de fatores genéticos relacionados à DN e ao sucesso na cessação tabágica^{29, 47, 50, 52, 53, 55, 57-60}. Os resultados deste estudo corroboram os achados de estudos anteriores. King *et al*⁴⁷ também identificaram significativa associação das variantes presentes no gene *CHRNA4* em resposta à vareniclina, mas não com bupropiona. Esta associação pode provavelmente ter ocorrido devido o gene *CHRNA4* codificar receptores, os quais são alvos específicos de ação da vareniclina.

Neste estudo, o grupo total de pacientes obteve P valor *borderline*, mas este provavelmente ocorreu devido ao grupo de pacientes tratados com vareniclina. Utilizou-se um modelo dominante para o polimorfismo *CHRNA4* (rs1044396), de acordo com estudos prévios^{82, 83}. Homogeneizando-se a amostra em uma análise somente com o grupo de pacientes autodeclarados brancos, retirando-se, assim, a influência do fator etnia, os resultados também foram significantivos. Os resultados deste estudo corroboram as associações encontradas em trabalhos envolvendo o alelo T para o

rs1044396 com outros fenótipos, tais como: menores níveis de depressão, ansiedade, instabilidade emocional e menor propensividade para DN ^{54, 57, 82, 83}.

Até o presente momento, há poucos estudos sobre a farmacogenética da vareniclina ^{29, 47}. King *et al* ⁴⁷ mostraram evidências que múltiplos *locos* contribuem para a resposta na cessação tabágica. Eles também sugerem que diferentes *locos* estão associados com as respostas à vareniclina vs bupropiona. Swan *et al* ²⁹ mostraram a associação de variantes no gene *CHRNA4* com náusea, um efeito adverso reportado como o motivo mais comum para a descontinuação da vareniclina. Eles concluíram que futuras investigações farmacogenéticas são necessárias. Em relação à implicação funcional do polimorfismo rs1044396, esta ainda não está bem estabelecida. Winterer *et al* ⁸⁶ realizaram um estudo funcional para o polimorfismo rs1044396. Eles introduziram um DNA complementar contendo o rs1044396 em ovócitos de *Xenopus* expressando nAChR ($\alpha 4\beta 2$) humanos. Eles mensuraram a resposta eletrofisiológica dos receptores sob o aumento da concentração da acetilcolina e observaram que o número de nAChRs ($\alpha 4\beta 2$) em estado de alta afinidade foi diferente entre os haplótipos. De forma geral, o estado de alta afinidade indica que menor concentração do ligante é suficiente para ocupar completamente o sítio de ligação do receptor e desencadear uma resposta fisiológica ^{86, 87}. Dessa forma, sugere-se que o achado funcional pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pela associação do *CHRNA4* (rs1044396) com o sucesso na cessação tabágica em cenário de vida real. Na mesma linha de pensamento, uma forte possibilidade para a funcionalidade desse polimorfismo é que este pode estar em desequilíbrio de ligação com algum bloco haplotípico, como, por exemplo, os blocos reportados por Feng *et al* ⁵⁴ (rs2273504, rs2273502, rs1044396, rs1044397, rs3827020 e rs2236196) e por Han *et al* ⁵¹ (rs2236196, rs3787138, rs10443196, rs1044394 e rs6010918).

Estudos de Markou *et al*⁸⁸ e Paperwalla *et al*⁸⁹ mostraram que a depressão e a ansiedade são comorbidades relacionadas com a dependência à nicotina. Dessa forma, estudos futuros poderiam realizar a avaliação de endofenótipos, na tentativa de elucidar os mecanismos pelos quais polimorfismos presentes no gene *CHRNA4* poderiam implicar ou não na relação entre desordens psiquiátricas, DN e cessação tabágica⁵⁷.

Em relação aos polimorfismos *CHRNA4* (rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660 e rs2072661), não foram identificados achados significantes para a resposta às terapias de cessação tabágica. Os resultados deste estudo corroboram os achados de estudos prévios. Um estudo envolvendo 925 fumantes tratados com TRN do Reino Unido também não encontrou associação dos polimorfismos *CHRNA4* (rs2236196) e *CHRNA2* (rs2072660) com cessação tabágica, mas eles também não encontraram associação do rs1044396 com resposta à TRN⁹⁰. Em contrapartida, em um estudo clínico de vareniclina, King *et al*⁴⁷ encontraram a associação do alelo G para o polimorfismo *CHRNA4* (rs2236196) com abstinência contínua de 9 a 12 semanas. Hutchison *et al*⁵⁶ reportaram, em fumantes de ancestralidade europeia, que o alelo G para o polimorfismo rs2236196 foi associado com a resposta diferencial à farmacoterapia, em um estudo clínico que comparava diferentes formas de tratamento com TRN. Outros estudos mostraram associações do *CHRNA2* (rs2072660) com a taxa de abstinência em pacientes tratados com bupropiona⁶⁰ e do *CHRNA2* (rs2072661) com o sucesso na resposta ao adesivo de nicotina⁹¹.

Em relação aos escores de FTND e Issa, nenhuma associação significativa foi encontrada para os polimorfismos estudados. De modo similar, alguns estudos não encontraram associação desses polimorfismos com DN^{51, 54, 55, 92}. Contudo, alguns estudos reportaram a associação dos polimorfismos *CHRNA4* (rs1044396 e rs2236196) com DN. Breitling *et al*⁵⁷ mostraram que o alelo C, para o polimorfismo *CHRNA4*

(rs1044396), e o alelo G, para o rs2236196, podem estar associados com alto risco para DN em alemães. Li *et al* ⁵⁵ mostraram a associação do rs2236196 com DN em afro-americanos portadores do alelo A. Uma interessante observação é que o menor alelo para o rs2236196 difere entre os grupos étnicos, G é o menor alelo em europeus e A é o menor alelo em afro-americanos. Esta diferença de frequência alélica pode estar associada com achados controversos entre *backgrounds* étnicos ⁵⁵. Para o gene *CHRNA4*, Wessel *et al* ⁵⁹ observaram a associação dos polimorfismos *CHRNA4* (rs2072660 e rs2072661) com a média do escore de FTND. Outro estudo interessante forneceu evidências sobre a presença de interação gene-gene entre os quatro genes (*CHRNA4*, *CHRNA4*, *BDNF*, e *NTRK2*) afetando ND ⁹³.

6.2 Para os resultados dos polimorfismos nos genes *CYP2B6* e *ANKK1*

O principal achado, para as análises nos genes *CYP2B6* e *ANKK1*, foi que no tratamento com bupropiona, os pacientes portadores do genótipo AA (selvagem), para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343), apresentaram maior taxa de sucesso no processo de cessação tabágica (46,6%), em relação aos pacientes portadores de ao menos um alelo G, para o rs2279343 (variante *4) (46,6%); sendo que o genótipo AA foi associado com maior OR (1,92) para o sucesso. No entanto, não foram encontradas associações desse polimorfismo com os escores de FTND e Issa para DN. Não foram encontrados resultados significativos para os polimorfismos *CYP2B6**5 (rs3211371), *6 (rs2279343 e rs3745274), *9 (rs3745274) e *ANKK1* (rs1800497) com nenhum dos fenótipos estudados. Além disso, não foram encontradas associações desses polimorfismos à resposta ao tratamento com vareniclina.

A *CYP2B6* é a principal isoenzima envolvida no metabolismo primário da bupropiona, a qual medeia quase que exclusivamente o processo de hidroxilação desse

fármaco, formando o metabólito hidroxibupropiona, além de possuir menor participação no metabolismo da nicotina ^{40, 41}. Considerando a importância dessa isoenzima, diversos pesquisadores têm estudado e encontrado associação de polimorfismos presentes no gene *CYP2B6* com a resposta à bupropiona na terapêutica de cessação tabágica ^{26, 47, 64}.

Os resultados deste estudo corroboram os achados de estudos anteriores. Um estudo realizado em 121 voluntários sadios mostrou que indivíduos portadores da variante *CYP2B6**4 apresentaram aumento da depuração de bupropiona e maior concentração de hidroxibupropiona no plasma ⁶⁷. Em resultados semelhantes, porém de outros fármacos metabolizados pela mesma isoenzima, células e bactérias *E. coli* expressando a *CYP2B6**4 também mostraram maior atividade catalítica para a metabolização de efavirenz ⁷² e maior depuração de nevirapina ⁷¹, respectivamente. Arioyshi *et al* ⁷² compararam a atividade catalítica da *CYP2B6* em células recombinantes de insetos (expressando a variante *4), frente aos substratos efavirenz e ciclofosfamida, e observaram comportamento invertido de metabolização, em relação aos dois fármacos (maior metabolização de efavirens e menor metabolização de ciclofosfamida), mostrando efeito substrato dependente. Em contrapartida, Holzinger *et al* ⁹⁴ e Levran *et al* ⁹⁵ não encontraram associação da variante*4 com a concentração plasmática de efavirenz e com a dose requerida de metadona, respectivamente.

A variante *CYP2B6**4 é um polimorfismo de troca de base única (A>G) no exon 5, gerando a troca do aminoácido lisina por arginina; a funcionalidade desse polimorfismo ainda não está bem estabelecida. Zanger *et al* ⁹⁶, em uma revisão, resume que o polimorfismo resulta em maior expressão da proteína com efeito substrato-dependente moderado.

A hipótese gerada neste estudo é de que portadores do genótipo AA (selvagem) para o polimorfismo *CYP2B6* (rs2279343), genótipo preditor de fenótipo metabólico

considerado normal, mantêm o fármaco em maior concentração plasmática e por maior quantidade de tempo no organismo, em relação aos pacientes portadores genótipos AG e GG (nos quais possuem maiores taxa metabolização para a bupropiona). Dessa forma, portadores do genótipo selvagem possuem maior chance de conseguir parar de fumar no tratamento com bupropiona.

Não foram encontrados resultados significativos para os polimorfismos *CYP2B6**5, *6 e *9 e *ANKK1* (rs1800497), assim como nos estudos de Kirchheiner *et al* ⁶⁷ e Burguer *et al* ⁹⁷, que também não encontraram associação dos polimorfismos *CYP2B6**5, *6 e *9 com a depuração de bupropiona, em relação ao genótipo selvagem (*CYP2B6**1), e não encontraram a associação da variante *5 com a farmacocinética de efavirenz em pacientes com HIV, respectivamente.

No entanto, Lerman *et al* ⁶⁴, em um estudo clínico, mostraram que portadores dos genótipos CT e TT, para a variante 5*, são menos prováveis de serem abstinentes ao tabaco e que a bupropiona parece diminuir esse efeito em mulheres, aumentando a chance de parar de fumar. Outros estudos apontaram que esse polimorfismo promove o aumento na especificidade catalítica da isoenzima, o qual pode ser compensado pela menor expressão da proteína ⁹⁶. Esse último achado pode, em parte, justificar o porquê da não associação da variante *5 com a resposta à bupropiona neste estudo.

Estudos têm mostrado a associação da variante *9 (rs3745274) com o aumento da concentração de efavirenz no plasma, sugerindo diminuição da função enzimática *in vivo* ^{68, 69, 96}. Hofmann *et al* ⁹⁸, em um estudo *in vitro*, mostraram a formação de *splicings* errôneos e a diminuição da expressão enzimática. A variante *6 (rs3745274 e rs2279343), um dos mais comuns haplótipos, também tem sido associada com a diminuição da função enzimática; o uso de modelagem farmacocinética e simulação tem sugerido a redução da dose de efavirenz em pacientes homozigotos para esta variante ⁷⁰.

Hesse *et al*⁹⁹ mostraram que fumantes portadores de pelo menos um alelo para a variante 6* possuem maior probabilidade de recaída com placebo, porém, são mais propensos a se beneficiar do tratamento com bupropiona.

Lerman *et al*⁸⁵ mostraram a associação do genótipo A2/A2 (GG) para o polimorfismo *ANKK1 Taq1A* (rs1800497) com melhor resposta à bupropiona. Em uma análise de interação intergênica, David *et al*²⁶ mostraram que os fumantes com genótipo GG, para o rs1800497, portadores de ao menos um alelo T para a variante*5, possuem maior chance de abstinência no tratamento com bupropiona.

Não encontramos resultados significativos na associação dos polimorfismos com DN. Em estudos semelhantes, Verde *et al*¹⁰⁰ não encontraram associação das variantes *4 e *9, com FTND, consumo de cigarros por dia e com o fato de ser fumante ou não; a variante *4 foi significativa somente para o consumo de maços de cigarros ao ano. Johnstone *et al*¹⁰¹ mostraram maior taxa de metabolização para a nicotina em portadores da variante *4; no entanto, quando se testou a relação entre a taxa de metabolização e o escore de FTND, não foi encontrada associação entre as duas variáveis. Quanto ao gene *ANKK1*, Bierut *et al*¹⁰² e Singleton *et al*¹⁰³ não encontraram associação do polimorfismo *ANKK1* (Taq1A) com DN; e Johnstone *et al*¹⁰⁴ não encontraram associação do polimorfismo *Taq1A* com o consumo de cigarros por dia ou com a iniciação tabágica.

Em contrapartida, Riccardi *et al*¹⁰⁵ relataram maior frequência de portadores de ao menos um alelo para a variante *6, entre os indivíduos dependentes à nicotina, em relação aos não dependentes. Erblich *et al*¹⁰⁶, em um estudo de estresse induzido por exposição controlada em laboratório, mostraram que os fumantes, portadores de ao menos um alelo A1 (AG ou AA), para o polimorfismo *ANKK1* (*Taq1A*), apresentaram maior desejo de fumar, em relação aos pacientes homozigóticos para o alelo A2 (GG).

Em um estudo familiar, o fenótipo de ser fumante parece ocorrer somente nos indivíduos portadores do alelo A1; sendo que o alelo A2 (G) não foi associado à iniciação tabágica, indicando ser um alelo protetor ¹⁰⁷.

6.3 Limitações do estudo

Há algumas limitações neste estudo. Primeiro, o tamanho amostral dos pacientes, tratados com vareniclina e com bupropiona, é relativamente pequeno e, conseqüentemente, o nosso poder estatístico é reduzido e um efeito de associação espúria é possível. Contudo, este trabalho foi efetivo para identificar diferenças significativas entre os genótipos, mesmo incluindo potenciais fatores de confusão. Em segundo lugar, não foi possível avaliar o principal achado no grupo de pacientes de etnia não-branca, por causa do pequeno número de pacientes. Nossa principal descoberta continua a ser significativa, mesmo em análise de pacientes autodeclarados brancos. Terceiro, não foi realizada análise prévia da função hepática dos pacientes, com base em exames laboratoriais; no entanto, como critério de exclusão para o estudo, os pacientes foram questionados quanto à presença de comorbidades hepáticas. Quarto, a escala do escore de FTND é pequena nesta casuística de pacientes, pois a maior parte dos pacientes atendidos no PAF foi classificada como dependente moderado ou altamente dependente. Quinto, foram utilizados modelos multivariados com variáveis disponíveis, nos quais não foi possível adicionar outros fatores ambientais que poderiam ser importantes, tais como a funcionalidade dos receptores, depressão e motivação.

7. CONCLUSÃO

Os polimorfismos *CHRNA4* (rs1044396) e *CYP2B6* (rs2279343) foram associados com a cessação tabágica em resposta à vareniclina e à bupropiona, respectivamente. Estes resultados podem indicar um possível desenho de farmacoterapia individualizada.

8 ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
.....BAIRRO: CIDADE
.....CEP: TELEFONE: DDD (.....)
.....
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Avaliação farmacogenética em pacientes tratados com fármacos antitabagismo”**

PESQUISADOR: Dr. Alexandre da Costa Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente, Médico Pesquisador – InCor – HCFMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 97329

UNIDADE DO HCFMUSP: InCor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

PESQUISADOR EXECUTANTE: Juliana da Rocha dos Santos

CARGO/FUNÇÃO: Mestranda – InCor – HCFMUSP

UNIDADE DO HCFMUSP: InCor - Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **2 anos**

Registro das explicações do pesquisador ao paciente ou seu representante legal sobre a pesquisa, consignando:

Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa. Este projeto tem como objetivos principais, para os indivíduos fumantes submetidos aos tratamentos farmacológicos antitabagismo, associar o efeito das alterações no DNA (polimorfismos) com a eficiência do medicamento, ou com os efeitos adversos relatados. Neste projeto vamos estudar o seu material genético (o DNA). O objetivo do estudo é saber por que algumas pessoas respondem bem aos medicamentos antitabagismo, enquanto outras pessoas não respondem e consequentemente não

conseguem parar de fumar. Para isto precisaremos de uma amostra de sangue (mesma quantidade de exames laboratoriais de rotina), assim como seu consentimento para que dados de seu prontuário médico sejam consultados. Os desconfortos mais comuns que podem ocorrer com sua participação neste estudo são os mesmos de uma coleta de sangue no braço, por exemplo, leve dor no local da punção e eventualmente leve dor ou hematoma local. Este sangue será encaminhado ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração onde será armazenado somente para a pesquisa. Sua participação é totalmente voluntária. Ainda, você poderá solicitar o seu desligamento deste projeto a qualquer momento bastando para tal entrar em contato com o Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (telefone (11) 2661-5995). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Alexandre da Costa Pereira, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Instituto do Coração, Bloco 2, andar 10, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, telefone (11) 2661-5995. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br. Poderá também solicitar a destruição das amostras de DNA que estarão armazenadas no mesmo laboratório.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Não há benefício direto para o participante. Porém, nossos resultados poderão encontrar relação entre as alterações estudadas no material genético (DNA) e condições de terapêutica antitabagismo.

Estas informações poderão auxiliar, posteriormente, na elaboração de programas eficazes para o uso da informação genética individual em usuários de medicamentos antitabagismo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação farmacogenética em pacientes tratados com fármacos antitabagismo**”. Eu discuti com o Dr. Alexandre da Costa Pereira e com a **Mestranda Juliana da Rocha dos Santos** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador executante

Data ____ / ____ / ____

9 REFERÊNCIAS

1. Jairam PM, de Jong PA, Mali WP, Isgum I, de Koning HJ, van der Aalst C, Oudkerk M, Vliegenthart R, van der Graaf Y. Impact of cardiovascular calcifications on the detrimental effect of continued smoking on cardiovascular risk in male lung cancer screening participants. *PLoS One*. 2013;8(6):e66484.
2. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2-e220.
3. MacLean DR, Chockalingam A. The global burden of cardiovascular diseases. *Can J Cardiol*. 1999;15(Suppl G):17G-9G.
4. Pappas RS, Polzin GM, Watson CH, Ashley DL. Cadmium, lead, and thallium in smoke particulate from counterfeit cigarettes compared to authentic US brands. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(2):202-9.
5. Oliveira AF, Valente JG, Leite IC. Aspects of tobacco attributable mortality: systematic review. *Rev Saude Publica*. 2008;42(2):335-45.
6. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, Wollum A, Sanman E, Wulf S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA*. 2014;311(2):183-92.
7. Brasil. IBGE Diretoria de pesquisas, Coordenação de trabalho e rendimento, Pesquisa nacional por amostra de domicílios. *Pesquisa especial de tabagismo (PETab) 2008*. 2011.
8. Pinto M, Uga MA. The cost of tobacco-related diseases for Brazil's Unified National Health System. *Cad Saude Publica*. 2010;26(6):1234-45.
9. Henningfield JE, Slade J. Tobacco-dependence medications: public health and regulatory issues. *Food Drug Law J*. 1998;53(suppl):75-114.
10. Laviolette SR, van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(1):55-65.
11. Benowitz NL. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med*. 1988;319(20):1318-30.

12. Laucht M, Becker K, Frank J, Schmidt MH, Esser G, Treutlein J, Skowronek MH, Schumann G. Genetic variation in dopamine pathways differentially associated with smoking progression in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47(6):673-81.
13. Leonard S, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res*. 2001;3(3):203-23.
14. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-38.
15. Fiore MC, Jaén CR, Baker TB, Bailey WC, Benowitz NL, Curry SJ, et al. *Treating tobacco use and dependence: 2008 update*. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2008.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: current cigarette smoking among adults aged ≥ 18 years --- United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010;59(35):1135-40.
17. Russo P, Cesario A, Rutella S, Veronesi G, Spaggiari L, Galetta D, Margaritora S, Granone P, Greenberg DS. Impact of genetic variability in nicotinic acetylcholine receptors on nicotine addiction and smoking cessation treatment. *Curr Med Chem*. 2011;18(1):91-112.
18. Gourlay SG, Benowitz NL. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62(4):453-63.
19. Rose JE, Mukhin AG, Lokitz SJ, Turkington TG, Herskovic J, Behm FM, Garg S, Garg PK. Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing ^{11}C -nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5190-5.
20. Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Olmstead RE, Farahi J, Scheibal D, Jou J, Allen V, Tiongson E, Chefer SI, Koren AO, Mukhin AG. Cigarette smoking saturates brain $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(8):907-15.
21. GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Joel G. Hardman, Lee E. Limbird, Alfred Goodman Gilman, editores. Tradução de Carla de Mello Vorsatz. et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2005.
22. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med*. 1986;37:21-32.
23. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*. 2005;57(1):79-115.

24. Hughes JR, Stead LF, Lancaster T. Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(1):CD000031.
25. Fiore MC, Bailey WC, Cohen SJ, Dorfman SF, Goldstein MG, Gritz ER, et al. *Treating tobacco use and dependence*. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2000.
26. David SP, Brown RA, Papandonatos GD, Kahler CW, Lloyd-Richardson EE, Munafo MR, Shields PG, Lerman C, Strong D, McCaffery J, Niaura R. Pharmacogenetic clinical trial of sustained-release bupropion for smoking cessation. *Nicotine Tob Res*. 2007;9(8):821-33.
27. Hartmann-Boyce J, Stead LF, Cahill K, Lancaster T. Efficacy of interventions to combat tobacco addiction: Cochrane update of 2012 reviews. *Addiction*. 2013;108(10):1711-21.
28. Coe JW, Brooks PR, Vetelino MG, Wirtz MC, Arnold EP, Huang J, Sands SB, Davis TI, Lebel LA, Fox CB, Shrikhande A, Heym JH, Schaeffer E, Rollema H, Lu Y, Mansbach RS, Chambers LK, Rovetti CC, Schulz DW, Tingley FD, O'Neill BT. Varenicline: an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J Med Chem*. 2005;48(10):3474-7.
29. Swan GE, Javitz HS, Jack LM, Wessel J, Michel M, Hinds DA, Stokowski RP, McClure JB, Catz SL, Richards J, Zbikowski SM, Deprey M, McAfee T, Conti DV, Bergen AW. Varenicline for smoking cessation: nausea severity and variation in nicotinic receptor genes. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(4):349-58.
30. Faessel HM, Burstein AH, Troutman MD, Willavize SA, Rohrbacher KD, Clark DJ. Lack of a pharmacokinetic interaction between a new smoking cessation therapy, varenicline, and digoxin in adult smokers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(11):1101-9.
31. Ravva P, Gastonguay MR, Tensfeldt TG, Faessel HM. Population pharmacokinetic analysis of varenicline in adult smokers. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(5):669-81.
32. Faessel HM, Obach RS, Rollema H, Ravva P, Williams KE, Burstein AH. A review of the clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of varenicline for smoking cessation. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(12):799-816.
33. Obach RS, Reed-Hagen AE, Krueger SS, Obach BJ, O'Connell TN, Zandi KS, Miller S, Coe JW. Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2 acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(1):121-30.
34. Faessel HM, Smith BJ, Gibbs MA, Gobey JS, Clark DJ, Burstein AH. Single-dose pharmacokinetics of varenicline, a selective nicotinic receptor partial agonist, in healthy smokers and nonsmokers. *J Clin Pharmacol*. 2006;46(9):991-8.

35. Feng B, Obach RS, Burstein AH, Clark DJ, de Morais SM, Faessel HM. Effect of human renal cationic transporter inhibition on the pharmacokinetics of varenicline, a new therapy for smoking cessation: an in vitro-in vivo study. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(4):567-76.
36. Faessel HM, Gibbs MA, Clark DJ, Rohrbacher K, Stolar M, Burstein AH. Multiple-dose pharmacokinetics of the selective nicotinic receptor partial agonist, varenicline, in healthy smokers. *J Clin Pharmacol.* 2006;46(12):1439-48.
37. Arias H. Molecular interaction of bupropion with nicotine acetylcholine receptors. *Pediatr Biochem.* 2010;1:185-97.
38. Foulds J, Burke M, Steinberg M, Williams JM, Ziedonis DM. Advances in pharmacotherapy for tobacco dependence. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2004;9(1):39-53.
39. Hughes J, Lindgren P, Connett J, Nides M. Smoking reduction in the Lung Health Study. *Nicotine Tob Res.* 2004;6(2):275-80.
40. Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, Greenblatt DJ. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(10):1176-83.
41. Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(10):1222-30.
42. Goodnick PJ. Pharmacokinetics of second generation antidepressants: bupropion. *Psychopharmacol Bull.* 1991;27(4):513-9.
43. Quaak M, van Schooten FJ, van Schayck CP. Pharmacogenetics of smoking: how far to the clinic? *Pharmacogenomics.* 2014;15(6):723-6.
44. Lerman C, Kaufmann V, Rukstalis M, Patterson F, Perkins K, Audrain-McGovern J, Benowitz N. Individualizing nicotine replacement therapy for the treatment of tobacco dependence: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2004;140(6):426-33.
45. Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. Tobacco addiction and pharmacogenetics of nicotine metabolism. *J Neurogenet.* 2009;23(3):262-71.
46. Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Lyons MJ, Tsuang M, True WR, Eisen SA. The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit. *Nicotine Tob Res.* 2003;5(2):245-54.
47. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti DV, Kaprio J, Lerman C, Park PW. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(3):641-50.

48. Lessov CN, Martin NG, Statham DJ, Todorov AA, Slutske WS, Bucholz KK, Heath AC, Madden PA. Defining nicotine dependence for genetic research: evidence from Australian twins. *Psychol Med*. 2004;34(5):865-79.
49. Broms U, Silventoinen K, Madden PA, Heath AC, Kaprio J. Genetic architecture of smoking behavior: a study of Finnish adult twins. *Twin Res Hum Genet*. 2006;9(1):64-72.
50. Chu CJ, Yang YC, Wei JX, Zhang L. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-4 polymorphisms with smoking behaviors in Chinese male smokers. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(11):1634-8.
51. Han S, Yang BZ, Kranzler HR, Oslin D, Anton R, Gelernter J. Association of CHRNA4 polymorphisms with smoking behavior in two populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011;156B(4):421-9.
52. Kamens HM, Corley RP, McQueen MB, Stallings MC, Hopfer CJ, Crowley TJ, Brown SA, Hewitt JK, Ehringer MA. Nominal association with CHRNA4 variants and nicotine dependence. *Genes Brain Behav*. 2013;12(3):297-304.
53. Wei J, Chu C, Wang Y, Yang Y, Wang Q, Li T, Zhang L, Ma X. Association study of 45 candidate genes in nicotine dependence in Han Chinese. *Addict Behav*. 2012;37(5):622-6.
54. Feng Y, Niu T, Xing H, Xu X, Chen C, Peng S, Wang L, Laird N. A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *Am J Hum Genet*. 2004;75(1):112-21.
55. Li MD, Beuten J, Ma JZ, Payne TJ, Lou XY, Garcia V, Duenes AS, Crews KM, Elston RC. Ethnic- and gender-specific association of the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene (CHRNA4) with nicotine dependence. *Hum Mol Genet*. 2005;14(9):1211-9.
56. Hutchison KE, Allen DL, Filbey FM, Jepson C, Lerman C, Benowitz NL, Stitzel J, Bryan A, McGeary J, Haughey HM. CHRNA4 and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(9):1078-86.
57. Breitling LP, Dahmen N, Mittelstrass K, Rujescu D, Gallinat J, Fehr C, Giegling I, Lamina C, Illig T, Muller H, Raum E, Rothenbacher D, Wichmann HE, Brenner H, Winterer G. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 4 polymorphisms with nicotine dependence in 5500 Germans. *Pharmacogenomics J*. 2009;9(4):219-24.
58. Ehringer MA, Clegg HV, Collins AC, Corley RP, Crowley T, Hewitt JK, Hopfer CJ, Krauter K, Lessem J, Rhee SH, Schlaepfer I, Smolen A, Stallings MC, Young SE, Zeiger JS. Association of the neuronal nicotinic receptor beta2 subunit gene (CHRNA2) with subjective responses to alcohol and nicotine. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(5):596-604.

59. Wessel J, McDonald SM, Hinds DA, Stokowski RP, Javitz HS, Kennemer M, Krasnow R, Dirks W, Hardin J, Pitts SJ, Michel M, Jack L, Ballinger DG, McClure JB, Swan GE, Bergen AW. Resequencing of nicotinic acetylcholine receptor genes and association of common and rare variants with the Fagerstrom test for nicotine dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2392-402.
60. Conti DV, Lee W, Li D, Liu J, Van Den Berg D, Thomas PD, Bergen AW, Swan GE, Tyndale RF, Benowitz NL, Lerman C. Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit gene implicated in a systems-based candidate gene study of smoking cessation. *Hum Mol Genet*. 2008;17(18):2834-48.
61. Zoli M, Lena C, Picciotto MR, Changeux JP. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci*. 1998;18(12):4461-72.
62. Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;147:1-46.
63. Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*. 2004;306(5698):1029-32.
64. Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Pinto A, Hawk L, Krishnan S, Niaura R, Epstein L. Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics*. 2002;12(8):627-34.
65. David SP, Niaura R, Papandonatos GD, Shadel WG, Burkholder GJ, Britt DM, Day A, Stumpff J, Hutchison K, Murphy M, Johnstone E, Griffiths SE, Walton RT. Does the DRD2-TaqlA polymorphism influence treatment response to bupropion hydrochloride for reduction of the nicotine withdrawal syndrome? *Nicotine Tob Res*. 2003;5(6):935-42.
66. Han DH, Joe KH, Na C, Lee YS. Effect of genetic polymorphisms on smoking cessation: a trial of bupropion in Korean male smokers. *Psychiatr Genet*. 2008;18(1):11-6.
67. Kirchheiner J, Klein C, Meineke I, Sasse J, Zanger UM, Mordt TE, Roots I, Brockmoller J. Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics*. 2003;13(10):619-26.
68. Telenti A, Zanger UM. Pharmacogenetics of anti-HIV drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:227-56.
69. Rakhmanina NY, van den Anker JN. Efavirenz in the therapy of HIV infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010;6(1):95-103.

70. Nyakutira C, Roshammar D, Chigutsa E, Chonzi P, Ashton M, Nhachi C, Masimirembwa C. High prevalence of the CYP2B6 516G-->T(*6) variant and effect on the population pharmacokinetics of efavirenz in HIV/AIDS outpatients in Zimbabwe. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(4):357-65.
71. Bertrand J, Chou M, Richardson DM, Verstuyft C, Leger PD, Mentre F, Taburet AM, Haas DW. Multiple genetic variants predict steady-state nevirapine clearance in HIV-infected Cambodians. *Pharmacogenet Genomics*. 2012;22(12):868-76.
72. Ariyoshi N, Ohara M, Kaneko M, Afuso S, Kumamoto T, Nakamura H, Ishii I, Ishikawa T, Kitada M. Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(11):2045-8.
73. Rieck M. *Influência dos genes DRD2 e ANKK1 na resposta ao tratamento da doença de Parkinson* [Tese]. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
74. Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, Hamon M, Gorwood P. The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res*. 2004;67(1):75-85.
75. Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat*. 2004;23(6):540-5.
76. Issa JS, Santos PC, Vieira LP, Abe TO, Kuperszmidt CS, Nakasato M, Cardoso E, Amorim C, Pereira AC. Smoking cessation and weight gain in patients with cardiovascular disease or risk factor. *Int J Cardiol*. 2014;172(2):485-7.
77. Issa JS, Abe TO, Moura S, Santos PC, Pereira AC. Effectiveness of coadministration of varenicline, bupropion, and serotonin reuptake inhibitors in a smoking cessation program in the real-life setting. *Nicotine Tob Res*. 2012;15(6):1146-50.
78. Fagerstrom KO, Heatherton TF, Kozlowski LT. Nicotine addiction and its assessment. *Ear Nose Throat J*. 1990;69(11):763-5.
79. Issa JS. A new nicotine dependence score and a new scale assessing patient comfort during smoking cessation treatment. *J Bras Pneumol*. 2012;38(6):761-5.
80. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics*. 2001;11(5):399-415.

81. Santos PC, Soares RA, Nascimento RM, Machado-Coelho GL, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. SLCO1B1 rs4149056 polymorphism associated with statin-induced myopathy is differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population: Amerindians as a high risk ethnic group. *BMC Med Genet*. 2011;12:136.
82. Markett S, Montag C, Reuter M. The nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 is associated with negative emotionality. *Emotion*. 2011;11(2):450-5.
83. Tsai SJ, Yeh HL, Hong CJ, Liou YJ, Yang AC, Liu ME, Hwang JP. Association of CHRNA4 polymorphism with depression and loneliness in elderly males. *Genes Brain Behav*. 2012;11(2):230-4.
84. Zhang H, Sridar C, Kenaan C, Amunugama H, Ballou DP, Hollenberg PF. Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: a charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome p450-reductase complex. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(3):803-9.
85. Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Hawk LH, Jr., Pinto A, Kucharski S, Krishnan S, Niaura R, Epstein LH. Effects of dopamine transporter and receptor polymorphisms on smoking cessation in a bupropion clinical trial. *Health Psychol*. 2003;22(5):541-8.
86. Winterer G, Rejescu D, Maier W, Steinlein OK, Bertrand D, Bertrand D. CHRNA4 Exon 5 genotype affects nicotinic receptor sensitivity and is associated with clinically high-functioning schizophrenia rapid drug treatment-response and superior prefrontal function. In: Paper Presented at the Nicotinic Acetylcholine Receptors, Wellcome Trust Conference. 18-21 May 2011. Hinxton, Cambridge, UK.
87. Greenwood PM, Parasuraman R, Espeseth T. A cognitive phenotype for a polymorphism in the nicotinic receptor gene CHRNA4. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(4):1331-41.
88. Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 1998;18(3):135-74.
89. Paperwalla KN, Levin TT, Weiner J, Saravay SM. Smoking and depression. *Med Clin North Am*. 2004;88(6):1483-94, x-xi.
90. Spruell T, Colavita G, Donegan T, Egawhary M, Hurley M, Aveyard P, Johnstone EC, Murphy MF, Munafo MR. Association between nicotinic acetylcholine receptor single nucleotide polymorphisms and smoking cessation. *Nicotine Tob Res*. 2012;14(8):993-7.
91. Perkins KA, Lerman C, Mercincavage M, Fonte CA, Briski JL. Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit (CHRNA2) gene and short-term ability to quit smoking in response to nicotine patch. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(10):2608-12.

92. Etter JF, Hoda JC, Perroud N, Munafo M, Buresi C, Duret C, Neidhart E, Malafosse A, Bertrand D. Association of genes coding for the alpha-4, alpha-5, beta-2 and beta-3 subunits of nicotinic receptors with cigarette smoking and nicotine dependence. *Addict Behav.* 2009;34(9):772-5.
93. Li MD, Lou XY, Chen G, Ma JZ, Elston RC. Gene-gene interactions among CHRNA4, CHRNA2, BDNF, and NTRK2 in nicotine dependence. *Biol Psychiatry.* 2008;64(11):951-7.
94. Holzinger ER, Grady B, Ritchie MD, Ribaud HJ, Acosta EP, Morse GD, Gulick RM, Robbins GK, Clifford DB, Daar ES, McLaren P, Haas DW. Genome-wide association study of plasma efavirenz pharmacokinetics in AIDS Clinical Trials Group protocols implicates several CYP2B6 variants. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(12):858-67.
95. Levran O, Peles E, Hamon S, Randesi M, Adelson M, Kreek MJ. CYP2B6 SNPs are associated with methadone dose required for effective treatment of opioid addiction. *Addict Biol.* 2013;18(4):709-16.
96. Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front Genet.* 2013;4:24.
97. Burger D, van der Heiden I, la Porte C, van der Ende M, Groeneveld P, Richter C, Koopmans P, Kroon F, Sprenger H, Lindemans J, Schenk P, van Schaik R. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;61(2):148-54.
98. Hofmann MH, Bliedernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325(1):284-92.
99. Hesse LM, He P, Krishnaswamy S, Hao Q, Hogan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics.* 2004;14(4):225-38.
100. Verde Z, Santiago C, Rodriguez Gonzalez-Moro JM, de Lucas Ramos P, Lopez Martin S, Bandres F, Lucia A, Gomez-Gallego F. 'Smoking genes': a genetic association study. *PLoS One.* 6(10):e26668.
101. Johnstone E, Benowitz N, Cargill A, Jacob R, Hinks L, Day I, Murphy M, Walton R. Determinants of the rate of nicotine metabolism and effects on smoking behavior. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(4):319-30.

102. Bierut LJ, Rice JP, Edenberg HJ, Goate A, Foroud T, Cloninger CR, Begleiter H, Conneally PM, Crowe RR, Hesselbrock V, Li TK, Nurnberger JI, Jr., Porjesz B, Schuckit MA, Reich T. Family-based study of the association of the dopamine D2 receptor gene (DRD2) with habitual smoking. *Am J Med Genet.* 2000;90(4):299-302.
103. Singleton AB, Thomson JH, Morris CM, Court JA, Lloyd S, Cholerston S. Lack of association between the dopamine D2 receptor gene allele DRD2*A1 and cigarette smoking in a United Kingdom population. *Pharmacogenetics.* 1998;8(2):125-8.
104. Johnstone EC, Yudkin P, Griffiths SE, Fuller A, Murphy M, Walton R. The dopamine D2 receptor C32806T polymorphism (DRD2 Taq1A RFLP) exhibits no association with smoking behaviour in a healthy UK population. *Addict Biol.* 2004;9(3-4):221-6.
105. Riccardi LN, Carano F, Bini C, Ceccardi S, Ferri G, Pelotti S. CYP2B6 Gene Single-Nucleotide Polymorphisms in an Italian Population Sample and Relationship with Nicotine Dependence. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19(2):103-7.
106. Erblich J, Lerman C, Self DW, Diaz GA, Bovbjerg DH. Stress-induced cigarette craving: effects of the DRD2 TaqI RFLP and SLC6A3 VNTR polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 2004;4(2):102-9.
107. Anokhin AP, Todorov AA, Madden PA, Grant JD, Heath AC. Brain event-related potentials, dopamine D2 receptor gene polymorphism, and smoking. *Genet Epidemiol.* 1999;17 (Suppl 1):S37-42.

APÊNDICE 1 - Teste de Fagerström para a dependência à nicotina (versão em Português)

1. Quanto tempo após acordar você fuma seu primeiro cigarro?	
(1) Dentro de 5 minutos	3
(2) Entre 6-30 minutos	2
(3) Entre 31-60 minutos	1
(4) Após 60 minutos	0
(5) Não fuma	
2. Você acha difícil não fumar em lugares proibidos, como igrejas, ônibus, etc.?	
(1) Sim	1
(0) Não	0
3. Qual cigarro do dia traz mais satisfação?	
(1) O primeiro da manhã	1
(2) Outros	0
(3) Nenhum	
4. Quantos cigarros você fuma por dia?	
(1) Menos de 10	0
(2) De 11 a 20	1
(3) De 21 a 30	2
(4) Mais de 31	3
(5) Não fuma	
5. Você fuma mais freqüentemente pela manhã?	
(1) Sim	1
(0) Não	0
6. Você fuma mesmo doente?	
(1) Sim	1
(0) Não	0

Conclusão sobre o grau de dependência:

0 - 2 pontos = muito baixo

3 - 4 pontos = baixo

5 pontos = médio

6 -7 pontos = elevado

8 -10 pontos = muito elevado

Fonte: Pietrobon RC, Barbisan JN, Manfroi WC, Utilização do teste de dependência à nicotina de Fagerström como um instrumento de medida do grau de dependência. Versão em Português. *Rev HCPA* 2007;27(3):31-6.

APÊNDICE 2 - Escore de consumo situacional Issa

1. Necessita fumar para melhorar atenção, concentração e produção?	Sim	Não
2. Necessita fumar quando esta ansioso(a),tenso(a) ou preocupado(a)?	Sim	Não
3. Necessita fumar quando esta triste ou aborrecido(a)?	Sim	Não
4. Necessita fumar quando esta tomando bebida alcoólica, após refeição ou quando está em ambientes festivos?	Sim	Não
Resultados: cada resposta "sim" equivale a 1 ponto. Até 1 ponto: baixa dependência; 2-3 pontos: moderada dependência; e 4 pontos: alta dependência.		

Fonte: Issa, J S. Um novo escore para dependência a nicotina e uma nova escala de conforto do paciente durante o tratamento do tabagismo. *J Bras Pneumol* 38(6): 761-5.