PAULO ROBERTO XAVIER TOMAZ

Avaliação do efeito de polimorfismos genéticos com a dependência à nicotina

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
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tomaz, Paulo Roberto Xavier
Avaliação do efeito de polimorfismo genéticos com a dependência à nicotina / Paulo Roberto Xavier Tomaz. -- São Paulo, 2016.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientador: Paulo Caleb Júnior de Lima Santos.

Descritores: 1.Transtorno por uso de tabaco 2.Polimorfismo genético 3.Abandono do hábito de fumar 3.Receptor colinérgico nicotínico neuronal polipeptídeo alfa-2 humano 4.Receptor nicotínico subunidade alfa-3 5.Receptor colinérgico nicotínico neuronal polipeptídeo alfa-5 humano 6.Receptor acetilcolínico neuronal subunidade beta-3 humano

USP/FM/DBD-003/16

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria realizado em minha vida.

Aos meus pais Marilucia e Roberto, à minha vó Maria Luiza e ao meu irmão Vinícius, pelo apoio, paciência e por sempre estarem comigo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Paulo Caleb

Palavras não bastam para expressar o quanto aprendi e ainda aprenderei com você. Muito obrigado por todos os ensinamentos, por toda dedicação, paciência, incentivo, obrigado pelos "puxões de orelha", foram eles que muitas vezes me fizeram pensar e melhorar cada vez mais, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Se hoje estou aqui, grande parte dessa trajetória devo a você! Obrigado!

À minha grande amiga mestra, Juliana Rocha

Juliãna, nem preciso dizer o quanto você foi essencial para a realização deste trabalho e para o meu conhecimento e crescimento profissional. Obrigado por todas as dicas, ajudas, críticas, incentivos e brincadeiras. Muitas vezes, quando batia aquele desanimo, você sempre estava lá para dizer: Paulo, acredite, tenha fé, não desista! Obrigado Ju, quero ter a sua amizade para a vida inteira!

Aos Doutores Alexandre Pereira, Jaqueline Issa e André Negrão

Obrigado pelas dicas, instruções e sugestões. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigado por participarem da minha banca no exame de qualificação.

Aos meus amigos de faculdade, da vida e do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular: Bárbara, Paula Fernanda, Francisco, Noely, Renata Alonso, Mirian Ibanez, Aline Morgan, Filipe, Leiliane, Carolina Capelli, Carolina Tosin, Patrícia Cajoeiro, Pamela Rodrigues, Fábio, Tatiane, Larissa, Nilse, Marina, Michele

Sabrina, Rafael Reis, Vanessa, Renata Watanabe, Vytor, Aline Aranha, Joceli, Théo, André Vaquero e Luciana Turolla

Muito obrigado pelas aventuras, companheirismo, parceria, momentos e almoços juntos. De alguma forma todos contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado amigos!

A Deus

Senhor, que rege a minha vida e de toda minha família, obrigado. Eu acredito no Senhor, eu tenho fé, e por esse motivo estou aqui, concluindo mais uma etapa da minha vida, graças ao Senhor, meu Deus! Amém!

À minha família

Pai, mãe, vó e irmão. Vocês são tudo para mim, são a minha base, a minha felicidade, a minha vida. Obrigado por estarem sempre comigo, por me formarem, por me apoiarem e por me incentivarem sempre. Se hoje estou aqui, se sou um profissional, uma pessoa de bem, sou só o resultado de tudo que me ensinaram. Vocês são os melhores! Amo cada um, infinitamente!

À CAPES e à FAPESP

Agradeço o apoio financeiro para a execução desse trabalho.

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o SENHOR, porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos."

Isaías 55:8-9

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 Dados gerais e epidemiológicos do tabagismo..... 01

1.2 Propriedades da nicotina..... 02

1.3 Ferramentas para avaliar a dependência à nicotina..... 03

1.4 Avaliação do conforto do paciente sob o tratamento antitabágico..... 03

1.5 Fatores que podem influenciar na iniciação e manutenção do tabagismo..... 04

1.6 Principais loci e genes envolvidos na dependência à nicotina..... 05

2 JUSTIFICATIVA..... 07

3 OBJETIVOS..... 08

3.1 Primário..... 08

3.2 Secundário..... 08

4 MÉTODOS..... 09

4.1 Casuística..... 09

4.2 Comitê de ética em pesquisa..... 10

4.3 Amostras biológicas..... 11

4.4 Extração e avaliação do DNA genômico..... 11

4.5 Padronização da genotipagem..... 12

4.5.1 Descrição dos polimorfismos e da metodologia de genotipagem adotada. 12

4.5.2 Desenho e seleção dos *primers*..... 13

4.5.3 Gradiente de temperatura dos *primers*..... 13

4.6 Genotipagem pela metodologia de HRM..... 14

4.7 Escores de dependência à nicotina..... 17

4.8 Escala de conforto PAF..... 18

4.9 Análises estatísticas..... 19

5 RESULTADOS..... 21

5.1 Características gerais e clínicas dos pacientes..... 21

5.2 Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*..... 21

5.3 Escores de dependência, escala de conforto ao tratamento e alelos de risco 22

5.4 Grupos medicamentosos e resultado do tratamento antitabagismo..... 23

5.5 Resultados dos pacientes quanto ao escore de FTND e alelos de risco..... 24

5.5.1 Análise de regressão linear do escore de FTND de acordo com os polimorfismos e alelos de risco..... 24

5.6 Taxa de sucesso no processo de cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos e alelos de risco..... 25

5.7 Análise de regressão logística multivariada..... 27

5.7.1 Análise de regressão logística multivariada para os polimorfismos e alelos de risco..... 27

5.7.2 Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação

tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 em mulheres e homens..... 27

6 DISCUSSÃO..... 30

6.1 Polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB3* e escore de FTND..... 30

6.2 Escala de conforto PAF..... 32

6.3 Polimorfismos no gene *CHRNA5* e resultado do tratamento..... 33

6.4 Polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNB3* e desfecho de tratamento..... 37

6.5 Limitações do estudo..... 37

7 CONCLUSÕES..... 38

8 ANEXOS – Termo de consentimento livre e esclarecido..... 39

– Aprovação do comitê de ética institucional..... 41

9 REFERÊNCIAS…… 43

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

APÊNDICE 2 – Escore de consumo situacional Issa

APÊNDICE 3 – Escala de conforto PAF

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AC	Abstinência contínua
CHRNA2	Gene que codifica a subunidade α2 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
CHRNA3	Gene que codifica a subunidade α3 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
CHRNA5	Gene que codifica a subunidade α5 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
CHRNB3	Gene que codifica a subunidade β3 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos
DN	Dependência à nicotina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dinucleotídeos: dATP, dCTP, dGTP e dTTP
DSM	Manual de diagnóstico e estatística
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Escore Issa	Escore de consumo situacional Issa
FDA	Agência sanitária do governo americano que controla alimentos e fármacos - *Food and Drug Administration*
FTND	Teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fargeström test for nicotine dependence*
FTQ	Questionário de tolerância
GWAS	Estudos amplos do genoma - *Genome wide association*
HRM	Análise da curva de melting - *High Resolution melting*
HSI	Índice de tabagismo pesado
HWE	Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*
InCor	Instituto do Coração, São Paulo – SP
K_3EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
Na_2EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico

nAChR	Receptores acetilcolínicos nicotínicos
NaCl	Cloreto de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
OCT2	Transportador catiônico orgânico
OR	Taxa de risco - *Odds ratio*
PAF	Programa de Assistência ao Fumante
PCR	Amplificação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TAE	Tampão formado com Tris, Acetato e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris-HCl	Tris e ácido clorídrico
TRN	Terapia de reposição nicotínica
α2	Subunidade alfa 2 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
α3	Subunidade alfa 3 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
α4	Subunidade alfa 4 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
α5	Subunidade alfa 5 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
β2	Subunidade beta 2 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais
β3	Subunidade beta 3 dos receptores acetilcolínicos nicotínicos neuronais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo (n=1049)..... 21

Tabela 2 - Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*..... 22

Tabela 3 - Escores de dependência, escala de conforto ao tratamento e alelos de risco..... 22

Tabela 4 - Frequência de pacientes de acordo com o grupo medicamentoso e desfecho do tratamento antitabagismo..... 23

Tabela 5 - Resultados dos pacientes quanto ao escore de FTND e alelos de risco..... 24

Tabela 6 - Modelo de regressão linear para o escore de FTND..... 25

Tabela 7 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos e alelos de risco..... 26

Tabela 8 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso no grupo de pacientes de acordo com os polimorfismos e alelos de risco..... 27

Tabela 9 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 (n=389) e rs2036527 (n=391) em mulheres..... 28

Tabela 10 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 (n=342) e rs2036527 (n=343) em homens..... 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do estudo..... 10

Figura 2 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA2* rs2472553 15

Figura 3 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA3* rs1051730 15

Figura 4 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968 16

Figura 5 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA5* rs2036527 16

Figura 6 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNB3* rs6474413 17

Figura 7 - Gráfico da frequência de pacientes de acordo com o escore de Fagerström..... 23

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos genes e polimorfismos analisados..... 12

Quadro 2 - Descrição dos *primers* desenhados pelo *software Primer 3*..... 13

Quadro 3 - Características dos escores..... 18

RESUMO

Tomaz PRX. *Avaliação do efeito de polimorfismos genéticos com a dependência à nicotina* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: A identificação de variantes genéticas que predispõem a maior susceptibilidade à dependência à nicotina pode ser importante para a prevenção e o tratamento do tabagismo. No contexto de medicina personalizada, os principais objetivos do presente estudo foram avaliar se polimorfismos nos genes *CHRNA2*, *CHRNA3*, *CHRNA5* e *CHRNB3* estão associados com o nível de dependência em indivíduos fumantes e com o resultado do tratamento antitabágico. ***Métodos:*** Estudo de coorte com 1049 pacientes fumantes que receberam tratamento farmacológico (vareniclina, vareniclina e bupropiona, bupropiona e/ou 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. A escala de conforto PAF foi utilizada para avaliar o conforto do paciente durante o tratamento. Os polimorfismos *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730, *CHRNA5* rs16969968, *CHRNA5* rs2036527 e *CHRNB3* rs6474413 foram genotipados pela análise da curva de *melting*. ***Resultados:*** As mulheres portadoras dos genótipos GA e AA para os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 obtiveram maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo: 44,0% e 56,3% (rs16969968), 41,5% e 56,5% (rs2036527), respectivamente; em comparação com as mulheres portadoras do genótipo GG: 35,7% (rs16969968) e 34,8% (rs2036527), (P=0,03; n=389; P=0,01; n=391). Os genótipos GA ou AA para os rs16969968 e rs2036527 foram associados com maior OR para o sucesso em mulheres (OR=1,63; IC 95%=1,04-2,54; P=0,03 e OR=1,59; IC 95%=1,02-2,48; P=0,04; respectivamente), em um modelo multivariado. Não foi encontrada associação dos polimorfismos no gene *CHRNA5* com o escore de FTND. Para os polimorfismos *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNB3* rs6474413 não foram encontradas associações significativas com os fenótipos estudados. ***Conclusão:*** Os polimorfismos rs16969968 e rs2036527 no gene *CHRNA5* foram associados com maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo em mulheres. Estes resultados podem contribuir com avanços na terapêutica baseada em medicina personalizada.

Descritores: transtorno por uso de tabaco; polimorfismo genético; abandono do hábito de fumar; receptor colinérgico nicotínico neuronal polipeptídeo alfa 2, humano; receptor nicotínico subunidade alfa3; receptor colinérgico, nicotínico, polipeptídeo alfa 5, humano; receptor acetilcolínico neuronal subunidade beta-3, humano.

ABSTRACT

Tomaz PRX. *Evaluation of genetic polymorphisms with nicotine dependence* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Background: The identification of genetic variants that predispose increased susceptibility to nicotine dependence becomes increasingly important for the prevention and smoking treatment. In the context of personalized medicine, the main aims of this study were to evaluate whether the *CHRNA2*, *CHRNA3*, *CHRNA5* and *CHRNB3* polymorphisms are associated with the level of dependence in smokers and the result of smoking treatment. ***Methods:*** This cohort study enrolled 1049 smoking patients who received pharmacological treatment (varenicline, varenicline plus bupropion, bupropion plus/or 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. PAF comfort scale was used to evaluate the comfort of the patient during treatment. The *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730, *CHRNA5* rs16969968 and rs2036527 and *CHRNB3* rs6474413 polymorphisms were genotyped by high resolution melting analysis. ***Results:*** Females with GA and AA genotypes for *CHRNA5* rs16969968 and rs2036527polymorphisms had higher success rate in smoking cessation treatment: 44.0% and 56.3% (rs16969968), 41.5% and 56.5% (rs2036527), respectively; compared with carriers of the GG genotypes: 35.7% (rs16969968), 34.8% (rs2036527), (P=0.03, n=389; P=0.01, n=391). The GA or AA genotypes to the rs16969968 and rs2036527 were associated with higher odds ratio for success in women (OR=1.63; 95%CI=1.04 to 2.54; P=0.03 and OR=1.59, 95%CI=1.02 to 2.48; P=0.04; respectively), in a multivariate model. We found no association of these polymorphisms with FTND score for nicotine dependence. For the *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNB3* rs6474413 polymorphisms no significant associations were found with phenotypes studied. ***Conclusion:*** The *CHRNA5* rs16969968 and rs2036527 were associated with higher success rate in the smoking cessation treatment in women. These results can contribute to major advances in personalized medicine based therapy.

Descriptors: tobacco use disorder; polymorphism, genetic; smoking cessation; neuronal nicotinic cholinergic receptor alpha polypeptide 2, human; nicotinic receptor subunit alpha3; cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 5, human; neuronal acetylcholine receptor subunit beta-3, human.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dados gerais e epidemiológicos do tabagismo

O tabagismo é a principal causa de morbidade evitável e mortalidade prematura em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 6 milhões de mortes por ano [1, 2]. O fumo está associado com a maioria das doenças cardiovasculares, cânceres e com pior qualidade de vida [2-4].

A prevalência de fumantes em nível global foi reduzida, no entanto, dados de 187 países mostraram que o número de fumantes diários aumentou significativamente de 721 milhões, em 1980, para 967 milhões, em 2012 [5].

A Pesquisa Especial de Tabagismo - PETAB (2008) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Ministério da Saúde (MS) e o Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostrou que cerca de 24,6 milhões de brasileiros a partir dos 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 em maior concentração na faixa etária entre 45 a 64 anos de idade (22,7%). No entanto, 93,0% dos fumantes afirmavam saber os malefícios do tabagismo e mais da metade alegaram que pensavam ou planejavam parar de fumar [6].

Estudos mostraram que embora a toxicidade do fumo esteja relacionada a outros componentes do cigarro, a nicotina é a responsável pelo desenvolvimento da dependência[7, 8]. O uso continuado da nicotina envolve melhora do humor, redução da abstinência e melhora do desempenho físico [9]. Em relação ao seu mecanismo, o qual pode ser bastante complexo, diversos neurotransmissores medeiam os efeitos psicoativos da nicotina; contudo, as vias dopaminérgicas são as mais estudadas [10]. Em sua atividade, a nicotina ativa os receptores neuronais acetilcolínicos nicotínicos

(nAChR), os quais promovem o aumento da liberação de dopamina mesolímbica [11]. Diante dos fatos mencionados, o uso continuado da nicotina pode induzir a sensibilização, o desejo e a recaída, gerando toxicodependência - Koob e Volkow [12] definiram como uma desordem crônica caracterizada pelo uso de drogas e a perda de controle sobre elas.

Diante do quadro de alta prevalência do tabagismo e forte possibilidade de dependência à nicotina (DN), o indivíduo que deseja parar de fumar tem a disposição tratamentos de primeira linha aprovados no Brasil: a terapia de reposição de nicotina (TRN), a bupropiona (um inibidor da recaptação da norepinefrina, dopamina e antagonista nicotínico), e a vareniclina (um agonista parcial dos nAChR α4β2) [13-15].

1.2 Propriedades da nicotina

Derivada da planta do tabaco *Nicotiana tabacum*, a nicotina é um alcaloide que contém alta concentração de nicotina em suas folhas [16]. A nicotina é absorvida através dos alvéolos pulmonares, chegando rapidamente à circulação arterial e sendo distribuída pelos tecidos até atingir o SNC em cerca de 10 a 19 segundos [17, 18]. No plasma e no SNC, os níveis de nicotina declinam rapidamente como resultado da distribuição para os tecidos periféricos [19]. Com tempo de meia vida de aproximadamente 2 horas [20], cerca de 70 a 80% da nicotina é metabolizada em cotinina e 4% em nicotina N'óxido. Como principal metabólito, a cotinina é metabolizada em 3'-hidroxicotinina, sendo encontrada em grande quantidade na urina. Existem as fases I e II do metabolismo da nicotina: na fase I ocorre à oxidação microssomal da nicotina e na fase II ocorrem o metabolismo da nicotina e dos seus metabólitos, principalmente pelas enzimas do fígado, CYP2A6, CYP2B6 e CYP2E1, para a cotinina [21, 22].

1.3 Ferramentas para avaliar a dependência à nicotina

Diversas ferramentas, tais como: o questionário de tolerância (FTQ), o teste de Fagerström para a dependência à nicotina (FTND), o índice de tabagismo pesado (HSI) e o manual de diagnóstico e estatística (DSM) têm sido utilizadas em todo o mundo, com o intuito de avaliar de forma mais eficaz a dependência física e química em relação ao fumo do tabaco [23-25].

No entanto, as medidas de dependência do tabaco mais frequentemente usadas são o FTQ e FTND, sendo que, o FTND foi extraído a partir do FTQ com o objetivo de superar as limitações de validade do seu antecessor [25]. O FTND é aplicado em diversos países por ser um método barato, rápido e não invasivo na avaliação da DN. O teste é compreendido por seis questões, gerando um escore que varia de 0 a 10 pontos, agrupando os indivíduos em 5 categorias de dependência [26].

Um escore desenvolvido recentemente, o escore de consumo situacional Issa, foi estabelecido em 2012 através do Programa de Assistência ao Fumante (PAF) do Instituto do Coração de São Paulo (InCor), com o objetivo de avaliar a DN baseando-se nos efeitos psicoativos da mesma. 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 possuem nível de dependência considerável em relação aos efeitos psicoativos da nicotina. São reclassificados os pacientes que obtiverem escore Issa $\geq$ 2 pontos, criando assim, a possibilidade de prescrição de fármacos antitabágicos [27].

1.4 Avaliação do conforto do paciente sob o tratamento antitabágico

Alguns instrumentos foram criados a fim de realizar o diagnóstico da síndrome de abstinência à nicotina, [28, 29] como também das escalas que avaliam a presença e

intensidade desses sintomas em pacientes que param de fumar [30]. Ainda assim, nenhuma escala havia sido desenvolvida para avaliar o desempenho dos fármacos antitabágicos durante o tratamento da síndrome de abstinência à nicotina. Dessa forma, uma ferramenta também criada pelo PAF, a escala de conforto PAF, avalia o desempenho dos fármacos antitabágicos durante o tratamento da síndrome de abstinência à nicotina, com pontuação de 0 a 38, indicando maior desconforto e maior conforto, respectivamente. Esta escala aplicada ao longo do tratamento permite avaliar a condição de adaptação do paciente à abstinência e a influência das condutas adotadas, buscando o melhor conforto para o paciente. Outra observação importante que a escala proporciona é que, quando o paciente permanece com pontuação abaixo de 20, faz-se necessário rever a conduta terapêutica [27].

1.5 Fatores que podem influenciar na iniciação e manutenção do tabagismo

São observados múltiplos fatores que podem contribuir para a variação individual em traços comportamentais pré-existentes de susceptibilidade e resistência à DN. Diversos estudos mostraram que fatores ambientais são fortes candidatos para influenciar na iniciação do tabagismo, enquanto que, fatores genéticos podem estar fortemente relacionados à persistência do fumo. As estimativas de herdabilidade para o fumo têm variado de 20 a 80% [23, 31-33].

O consumo de cigarros é classificado como um comportamento complexo que compreende múltiplos estágios como a iniciação, experimentação, uso regular, dependência, cessação e recaída [32, 34]. Para melhor compreender a importância da genética em todas as fases desses comportamentos, principalmente na DN, estudos com gêmeos, estudos de associação alélica sobre genes candidatos e estudos amplos do

genoma (GWAS) são cada vez mais necessários, a fim de fornecer dados que possam abranger a relação genética e tabagismo [23, 32, 34].

1.6 Principais *loci* e genes envolvidos na dependência à nicotina

Apesar de alguns estudos mostrarem que a genética pode ter grande influência na DN, os genes exatos que contribuem ainda não são claramente definidos. No entanto, nos últimos dez anos, diversos estudos identificaram uma região presente no cromossomo 15 que pode estar altamente envolvida no processo de patogênese da DN. Esses achados podem ser explicados pelo fato de que essa região do genoma compreende uma quantidade substancial de genes que codificam diversas subunidades dos nAChR. Esses receptores no SNC são responsáveis por mediar os efeitos da nicotina, que como vimos anteriormente, é a substância primária responsável por gerar o processo de dependência, contribuindo para o aumento do consumo do tabaco [23, 32, 35, 36].

Dessa forma, estudos identificaram a associação de múltiplos polimorfismos em genes que codificam as subunidades dos receptores nicotínicos (*CHRNA3, CHRNA5, CHRNB3 e CHRNB4*) com número de cigarros por dia, DN e risco para desenvolver câncer de pulmão no *locus* 15q25. 1 [32, 35, 37, 38].

Saccone *et al* [35], analizaram 3713 *SNPs* em 300 genes candidatos ao risco à DN em 1050 indivíduos casos e 879 controles. Após múltiplas correções, os principais polimorfismos associados à DN estavam localizados em genes que codificam os nAChR. Dentre eles, os polimorfismos *CHRNB3* rs6474413 e *CHRNA5* rs16969968 foram fortemente associados à DN. Os autores ressaltaram que o estudo conseguiu identificar um *loci* de risco para à DN, no entanto, estudos de replicação são necessários para confirmar.

Stevens *et al* [38], avaliaram 1452 fumantes pesados (ter fumado pelo menos 30 cigarros por dia, durante pelo menos 5 anos) e 1395 fumantes leves (ter fumado <5 cigarros por dia há pelo menos 1 ano). O objetivo era investigar se variantes em genes que codificam os nAChR estavam associadas ao comportamento de fumar. Dois grupos de *SNPs* no cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4* foram associados com tabagismo pesado. O primeiro grupo de oito *SNPs*, que incluía o polimorfismo *CHRNA5* rs16969968, foi associado com o aumento do risco para tabagismo pesado, enquanto que, o segundo grupo foi associado com a diminuição do risco. Os autores concluíram que o estudo foi capaz de identificar dois *loci* no cluster gênico *CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4* que preveem o comportamento de fumar, além do envolvimento da subunidade α5 do receptor acetilcolínico nicotínico com tabagismo pesado.

Caporaso *et al* [37], verificaram a contribuição das variantes genéticas sob o comportamento de fumar em análise conjunta de dois GWAS. Os fenótipos estudados foram número de cigarros por dia, idade de início do tabagismo, tempo de tabagismo e maços por ano. Nos genes *CHRNA3* e *CHRNA5* foram identificados diversos *SNPs* associados ao número de cigarros por dia, incluindo o rs1051730, que tem sido associado à DN, intensidade de fumar e o risco de câncer no pulmão.

2 JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a alta prevalência de fumantes, o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao tabaco, a forte possibilidade de dependência à nicotina, e a dificuldade do fumante abster-se do fumo, estudos que investiguem a variabilidade em relação à dependência ao tabaco e à resposta aos tratamentos antitabagismo são importantes.

Nossos resultados poderão evidenciar associações dos polimorfismos estudados com a dependência à nicotina. Além disso, poderão identificar possíveis subgrupos de pacientes maus respondedores e, dessa forma, possibilitar a otimização e a personalização do tratamento antitabágico.

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Avaliar a associação dos polimorfismos nos genes *CHRNA2*, *CHRNA3*, *CHRNA5* e *CHRNB3* com o nível de dependência em indivíduos fumantes.

3.2 Secundário

Avaliar a associação dos polimorfismos com o resultado do tratamento antitabágico.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Para a realização deste estudo de coorte foram recrutados 1049 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 novembro de 2014. Os dados dos pacientes que obtiveram desfecho no tratamento antitabágico foram observados no banco de dados do PAF.

O desenho do estudo foi baseado no PAF, que consistia de uma consulta médica inicial, e uma média de 4 consultas médicas de seguimento que eram distribuídas ao longo de 12 semanas. 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 e/ou 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 e/ou TRN. A prescrição 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 sintomas de abstinência moderados ou intensos 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) [39, 40]. A Figura 1 mostra o desenho do estudo.

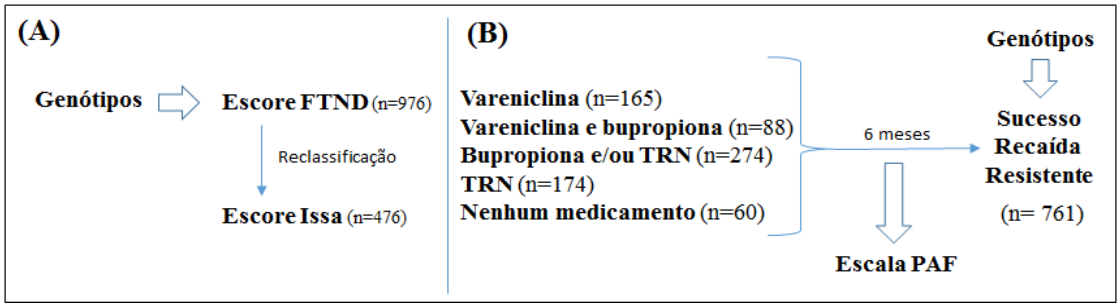

Figura 1 – Esquema do estudo. n total fumantes = 1049. A = Análise de associação dos genótipos com o nível de dependência. O escore Issa foi utilizado para reclassificar os pacientes com FTND <5. No entanto, o escore não foi utilizado para análise de associação dos genótipos devido à pequena variabilidade deste escore em nossa amostra. B = Análise de associação dos genótipos com os desfechos de tratamento após 6 meses de seguimento. Para avaliar o nível de conforto no tratamento foi utilizada a escala de conforto PAF. PAF 2ª, 3ª, 4ª e 5ª consultas realizadas após prescrição do medicamento (n=573; n=532; n=473; n=372, respectivamente). FTND = teste de Fagerström para a dependência à nicotina. Issa = escore de consumo situacional Issa. PAF = escala de conforto. Grupos medicamentosos: nenhum medicamento; TRN = terapia de reposição nicotínica (goma e/ou adesivo); bupropiona e/ou TRN (bupropiona, bupropiona e goma, bupropiona e adesivo ou bupropiona, goma e adesivo); vareniclina; vareniclina e bupropiona. 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 4024/14/004). Todos os pacientes foram informados do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos) e foram incluídos quando consentiram em participar.

4.3 Amostras biológicas

Foram coletados 8 mL de sangue, de cada indivíduo, por punção venosa; para isto, foram utilizados tubos a vácuo BD Vacutainer System® com anticoagulante K_3EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA).

4.4 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 NH_4HCO_3, 144mM NH_4Cl), 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 ressuspenso em 3 mL de tampão B (10 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 2 mM Na_2EDTA pH 8), 200 µL de SDS 10%, 500 µL de tampão C (50 µL de SDS 10%, 2µL de Na_2EDTA 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 ressuspendido em 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

Após a completa ressuspensão do *pellet*, diluiram-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.

4.5 Padronização da genotipagem

4.5.1 Descrição dos polimorfismos e da metodologia de genotipagem adotada

O Quadro 1 mostra a descrição dos polimorfismos estudados. A metodologia escolhida para a genotipagem dos polimorfismos foi a 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*).

Quadro 1 - Relação dos genes e polimorfismos analisados

Gene	Polimorfismo	Base nucleotídica	Aminoácido
CHRNA2	rs2472553	c.C674T	p.Thr22lle
CHRNA3	rs1051730	c.C645T	p.Tyr215Tyr
CHRNA5	rs16969968	c.G1192A	p.Asp398Asn
CHRNA5	rs2036527	g.G78559273A	
CHRNB3	rs6474413	c.-G1626A	

4.5.2 Desenho e seleção dos *primers*

Os *primers* (ou iniciadores) para os polimorfismos genotipados pela metodologia de HRM (*CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730, *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 e *CHRNB3* rs6474413) 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.

Quadro 2 - Descrição dos *primers* desenhados pelo *software Primer 3*

Polimorfismos	***Primer* F**	***Primer* R**
CHRNA2 rs2472553	CTGTGTTCCTGTCCTTCACAAA	TGACAGGTGACAAACACTCACC
CHRNA3 rs1051730	ACCTCAAGGACTATTGGGAGAG	GCAGTTGTACTTGATGTCGTGTT
CHRNA5 rs16969968	CTTCTAGAAACACATTGGAAGCTG	TGATGTGTCTTGTAATGTAGCGAAT
CHRNA5 rs2036527	AGACAGCTGTGGAACTGGAAAT	ATTCTAAGCCACCTGATCCAAA
CHRNB3 rs6474413	TGAAAATAAAGGTGAAACTTCCTG	AATGGTCTCAGGAGTAAATCAGC

4.5.3 Gradiente de temperatura dos *primers*

Primeiramente, os *primers* liofilizados foram ressuspendidos 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 para 5 pmol/µL 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 reação foi constituída de 0,4 µL de DNA genômico (20 ng), 2 µL de tampão (2mM $MgCl_2$, 200mM dNTPs), 0,4 µL 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 µL. 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 45ºC a 65ºC (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.*

4.6 Genotipagem pela metodologia de HRM

As análises dos genótipos para os polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNA5* e *CHRNB3* (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 µL (10ng) de DNA genômico, 2 µL de tampão (2 mM $MgCl_2$, 200mM dNTPs 200mM), 0,4 µL de cada *primer* (200 nM), 0,6 µL 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 94ºC por 120 s no primeiro ciclo, desnaturação em 94ºC por 20 s, anelamento de 60,0°C para o rs2472553, rs1051730, rs2036527, rs6474413 e 53,4°C para o rs16969968 por 20 s, e extensão de 72ºC por 22s. Na fase de HRM, o aparelho Rotor Gene 6000® mensurou a fluorescência em cada aumento de temperatura (0,1°C/s numa faixa de 70-94ºC, exceto para o rs16969968 e rs2036527 que tiveram uma faixa de 65-85ºC). 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) [41]. Os dois métodos geraram resultados idênticos em ambos os testes. Os genótipos selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado foram facilmente discriminados pela análise de HRM. Além disso, 9% das amostras foram selecionadas aleatoriamente, como controle de qualidade, gerando resultados idênticos.

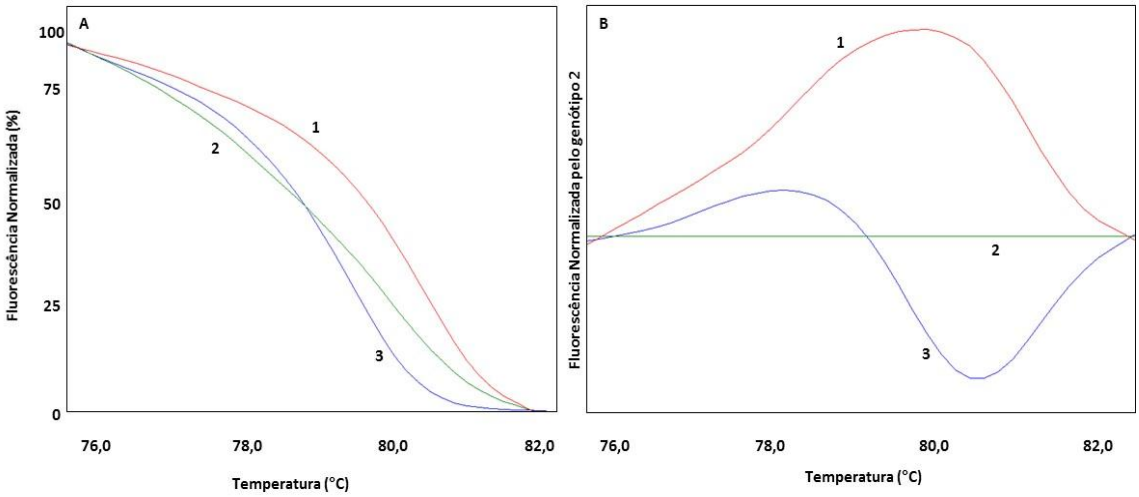

Figura 2 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA2* rs2472553. Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = CC; 2 = CT; 3 =TT.

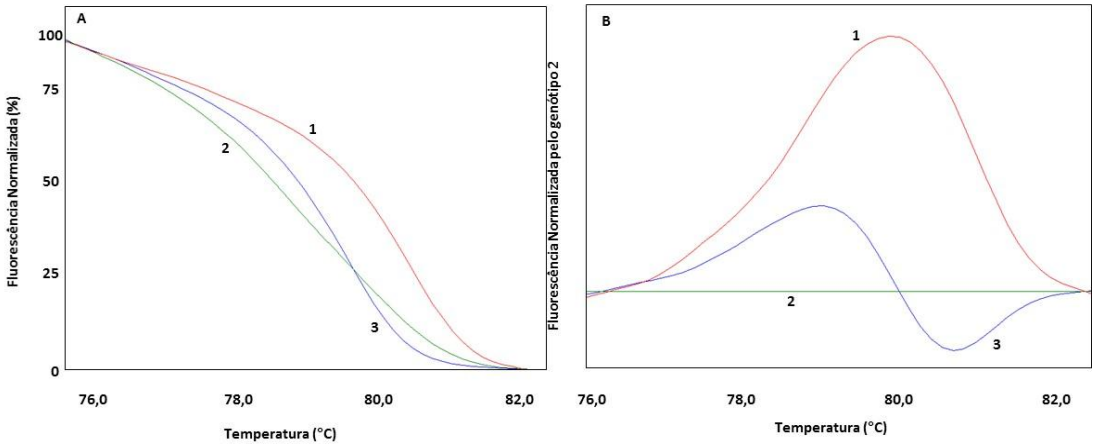

Figura 3 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA3* rs1051730. Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = CC; 2 = CT; 3 = TT.

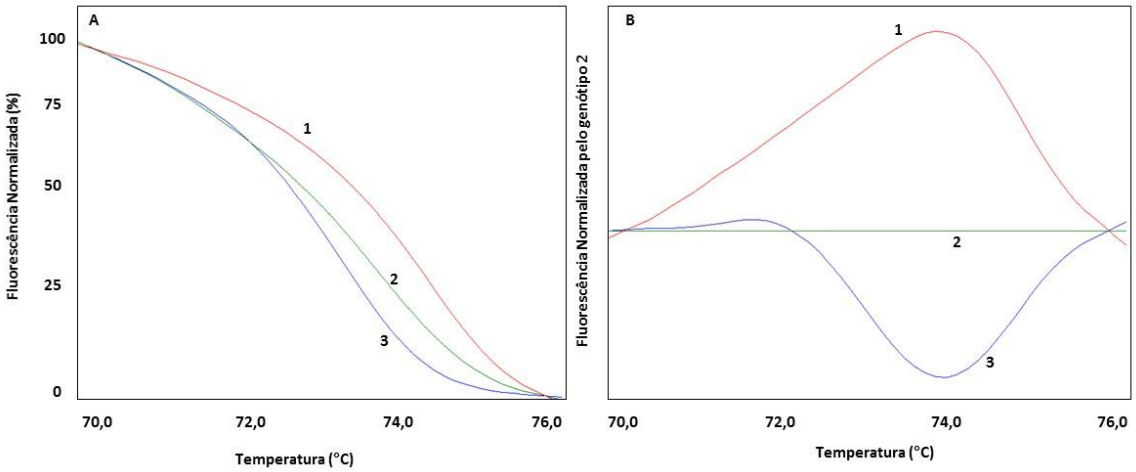

Figura 4 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968. Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = GG; 2 = GA; 3 = AA.

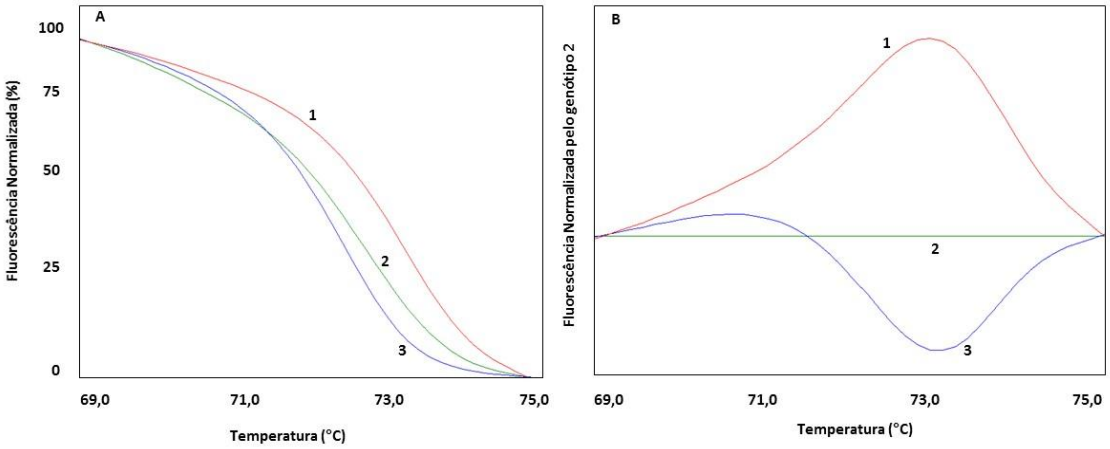

Figura 5 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNA5* rs2036527. Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = GG; 2 = GA; 3 = AA.

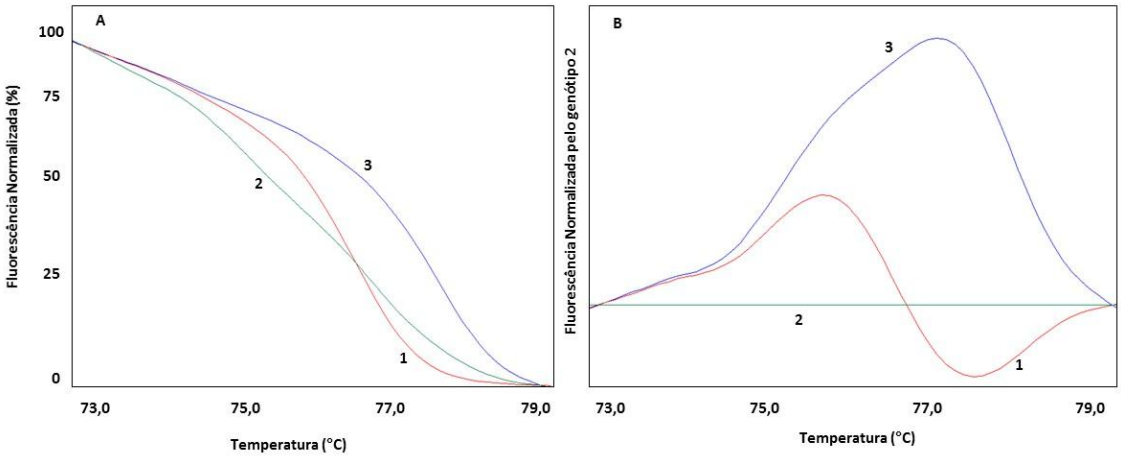

Figura 6 - Gráficos de genotipagem do polimorfismo *CHRNB3* rs6474413. Utilizando a análise da curva de *melting*, as trocas nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curvas. A: Gráfico de fluorescência normalizada pela temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseada no genótipo 2) pela temperatura. 1 = GG; 2 = GA; 3 = AA.

4.7 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 primeiro pode predizer a capacidade de o indivíduo parar de fumar. Quanto mais forte for a dependência, menos provável a cessação do fumo. O FTND, é uma versão revisada do FTQ, 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: muito baixa dependência = 1-2 pontos; baixa dependência = 3-4 pontos; dependência moderada = 5 pontos; alta dependência = 6-7 pontos; e muito alta dependência = 8-10 pontos [26]. O FTND é utilizado em muitos países como um método barato, fácil de ser aplicado e não invasivo para determinar a DN [26] (versão em português no Apêndice 1).

O escore Issa é baseado nos efeitos psicoativos da nicotina nos processos de cognição, atenção, concentração, humor, bem-estar e prazer [27] (versão em português no

Apêndice 2). É compreendido por quatro questões, com peso de 1 ponto para cada resposta afirmativa, gerando a pontuação final que varia de 0 a 4 pontos. 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 ≥ 2. Dessa forma, é possível considerar a prescrição de fármacos antitabágicos, facilitando o processo de cessação do fumo em determinado subgrupo de pacientes. No Quadro 3 podemos observar as principais características de ambos os testes.

Quadro 3 – Características dos escores

Escore	Pontuação	Interpretação	Avaliação	Uso primário
FTND	0-2 3-4 5 6-7 8-10	muito baixo baixo médio elevado muito elevado	Carga tabágica/CPD	Clínico/pesquisa descritiva
Issa	1 2-3 4	baixo moderado alto	Efeitos psicoativos	Clínico/pesquisa descritiva
PAF	0 a 38	0-maior desconforto 38-maior conforto	Conforto durante tratamento	Clínico/pesquisa descritiva

FTND = teste de Fagerström para a dependência à nicotina. Issa = escore de consumo situacional Issa. PAF = Escala de conforto PAF. CPD = cigarros por dia.

4.8 Escala de conforto PAF

A escala de conforto PAF foi realizada no intuito de avaliar o conforto do paciente com o tratamento proposto. A escala é composta por 10 itens, com pontuação de 0 a 38, no qual os valores 0 e 38 indicam maior desconforto e maior conforto, respectivamente (Apêndice 3). Esta escala, aplicada ao longo do tratamento, compara a

condição do paciente no início do tratamento com a situação atual, permitindo a avaliação contínua da condição de adaptação do paciente à abstinência e a influência das condutas adotadas, sempre buscando o melhor conforto do paciente ao longo do tratamento. O uso clínico dessa escala permite observar a necessidade de rever a conduta terapêutica quando o paciente apresenta resultados abaixo de 20. É importante salientar que o sistema PAF foi concebido com base na experiência clínica ambulatorial de atendimento e tratamento do tabagista ao longo de 16 anos de assistência especializada, contabilizando antes da sua criação mais de 3.000 pacientes tratados e aproximadamente 18.000 consultas realizadas. Podemos observar no Quadro 3 as principais características da escala [27].

4.9 Análises estatísticas

As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão e as variáveis categóricas como frequências. O teste Qui-quadrado foi realizado para as análises comparativas de desfecho do tratamento no grupo total de pacientes e nos grupos de mulheres e homens de acordo com os polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNA5* e *CHRNB3.* A análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* também foi realizada através do teste Qui-quadrado. O teste t de *Student* foi utilizado para comparar os valores do escore de FTND de acordo com os polimorfismos. O teste de *Friedman* foi utilizado para comparar as médias da escala de conforto PAF entre as 2ª, 3ª, 4ª e 5ª consultas dos pacientes de acordo com os grupos não sucesso e sucesso. Modelos de regressão linear foram realizados para avaliar a influência dos polimorfismos no FTND em presença das covariáveis: idade, gênero (homem), raça/cor autodeclarada (branca) e escolaridade. Modelos de regressão logística multivariado foram utilizados para avaliar a taxa de risco (*odds ratio* - OR) para o sucesso de acordo

com os polimorfismos e alelos de risco. Foram utilizadas nos modelos, as covariáveis: idade, raça/cor autodeclarada (branca), escore de FTND e grupo medicamentoso. O modelo dominante foi escolhido baseado em estudos prévios: *CHRNA2* rs2472553 (CC *vs* CT+TT) [42], *CHRNA3* rs1051730 (CC *vs* CT+TT) [43], *CHRNA5* rs16969968 (GG *vs* GA+AA) [44], *CHRNA5* rs2036527 (GG *vs* GA+AA) [45] e *CHRNB3* rs6474413 (GG *vs* GA+AA) [36]. Os alelos de risco foram analisados como variável contínua (somatório dos números de alelos de risco) e como variável categórica (número <5 ou ≥5 alelos de risco). As análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS (v.16.0), com o nível de significância de P≤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=1049)

Idade (anos)	54 ± 15
Gênero, mulheres (%)	54,7
Raça/cor autodeclarada, brancos (%)	65,8
Índice de massa corporal (Kg/m^2)	27 ± 5
Escolaridade, nível superior (%)	26,6
Hipertensão (%)	49,0
Doença arterial coronariana (%)	19,9
Infarto agudo do miocárdio (%)	22,0
Dislipidemia (%)	43,1
Diabetes melito tipo 2 (%)	15,7
Depressão (%)	19,7
Ansiedade (%)	19,0
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	16,2
Asma (%)	1,3
Número de doenças diagnosticadas	2,7 ± 1,7

Devido a não amplificação de algumas amostras durante a genotipagem, o tamanho amostral (n=1049) foi reduzido em relação aos polimorfismos rs2472553, rs1051730, rs16969968, rs2036527 e rs6474413 (n=1018; n=1024; n=1012; n=1014; n=1006), respectivamente.

5.2 Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

A Tabela 2 mostra a frequência alélica e a distribuição genotípica de cada polimorfismo, os quais estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE).

Tabela 2 - Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

CHRNA2 **rs2472553**	***CHRNA3*** **rs1051730**	***CHRNA5*** **rs16969968**	***CHRNA5*** **rs2036527**	***CHRNB3*** **rs6474413**
		Distribuição genotípica (%)		
CC= 76,2 (n=776)	CC= 42,1 (n=431)	GG= 43,0 (n=435)	GG= 39,6 (n=402)	GG= 8,3 (n=83)
CT= 21,9 (n=223)	CT= 45,6 (n=467)	GA= 44,9 (n=454)	GA= 46,0 (n=466)	GA= 42,4 (n=427)
TT= 1,9 (n=19)	TT= 12,3 (n=126)	AA= 12,1 (n=123)	AA= 14,4 (n=146)	AA= 49,3 (n=496)
		Alelo de menor frequência (%)		
Alelo T= 12,8	Alelo T= 35,1	Alelo A= 34,6	Alelo A= 37,4	Alelo G= 29,5
		HWE		
$X^2 = 0,41$	$X^2 = 0,0008$	$X^2 = 0,07$	$X^2 = 0,34$	$X^2 = 0,44$
P valor = 0,52	P valor = 0,98	P valor = 0,79	P valor = 0,56	P valor = 0,51

Alelo de menor frequência encontrado na presente casuística (pacientes provenientes do Programa de Assistência ao Fumante - PAF). n = número amostral. HWE = Equilíbrio de *Hardy-Weinberg.* Se P < 0,05 não consistente com HWE.

5.3 Escores de dependência, escala de conforto ao tratamento e alelos de risco

A Tabela 3 mostra a frequência, a média e o desvio padrão dos escores de FTND, Issa e PAF dos pacientes e o somatório dos alelos de risco para DN. A figura 7 mostra a frequência de pacientes de acordo com o escore de Fagerström (escala de 0 a 10).

Tabela 3 – Escores de dependência, escala de conforto ao tratamento e alelos de risco

FTND ≥6	**(%)**	**Média e DP**			
	69,5	6,5 ± 2,4			
Issa	**Média e DP**				
	3,0 ± 0,8				
PAF	**PAF 2**	**PAF 3**	**PAF 4**	**PAF 5**	**P valor**
Grupo total	12,9 ± 12,6	16,6 ± 12,4	17,9 ± 12,1	18,0 ± 12,2	
Não sucesso	9,7 ± 12,2	13,1 ± 12,5	15,2 ± 12,6	12,4 ± 12,7	0,04
Sucesso	14,6 ± 12,2	18,4 ± 11,6	17,9 ± 12,0	18,6 ± 12,3	0,001
Alelos de risco ≥5	**(%)**	**Média e DP**			
	39,3	3,8 ± 2,2			

FTND = teste de Fagerström para a dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=976). Escore Issa = escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=476). PAF = Escala de conforto PAF (escala de 0 a 38 pontos). PAF 2, 3, 4 e 5 consultas realizadas após prescrição do medicamento. (n=573; n=532; n=473; n=372), respectivamente. PAF (2, 3, 4 e 5) *vs.* não sucesso (n=117). PAF (2, 3, 4 e 5) *vs.* sucesso (n=162). Alelos de risco = Somatório dos alelos de risco para a dependência à nicotina (TTAAA) (escala de 0 a 10) (n=969). DP = desvio padrão.

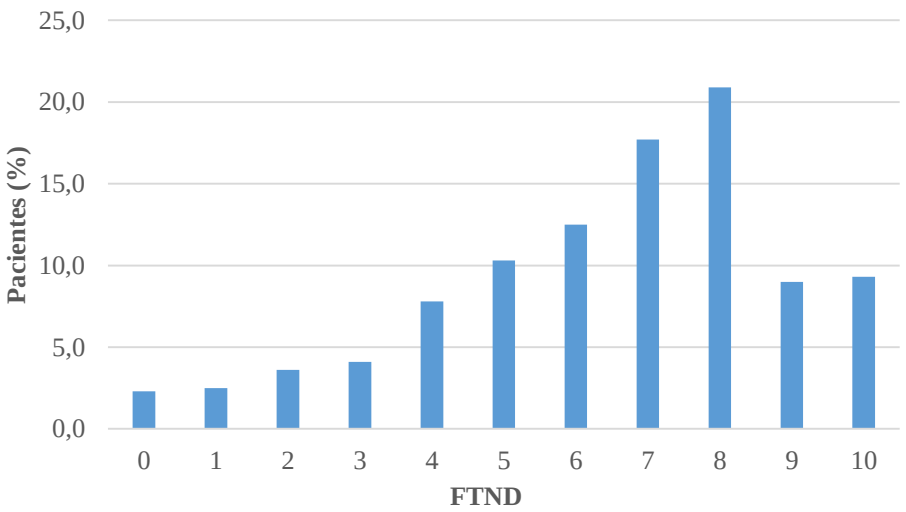

Figura 7 – Gráfico da frequência de pacientes de acordo com o escore de Fagerström (escala de 0 a 10), (n=976). FTND = teste de Fagerström para a dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence.*

5.4 Grupos medicamentosos e resultado do tratamento antitabagismo

A Tabela 4 mostra a frequência de pacientes de acordo com o grupo medicamentoso e desfecho do tratamento antitabagismo.

Tabela 4 - Frequência de pacientes de acordo com o grupo medicamentoso e desfecho do tratamento antitabagismo

Grupo medicamentoso	**Pacientes (%)**
Vareniclina	21,7
Vareniclina e bupropiona	11,6
Bupropiona e/ou TRN	36,0
TRN	22,9
Nenhum	7,9
Desfecho de tratamento	
Sucesso	45,9
Recaída	30,6
Resistente	23,5

TRN = terapia de reposição nicotínica (goma e/ou adesivo). Bupropiona e/ou TRN (bupropiona, bupropiona e goma, bupropiona e adesivo ou bupropiona, goma e adesivo). 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. n=761.

5.5 Resultados dos pacientes quanto ao escore de FTND e alelos de risco

A tabela 5 mostra a frequência, a média e o intervalo de confiança (IC) dos pacientes de acordo com o escore de FTND e alelos de risco. Não houve diferença significativa entre as médias de FTND de acordo com os grupos de genótipos, como também entre as categorias dos alelos de risco.

Tabela 5 – Resultados dos pacientes quanto ao escore de FTND e alelos de risco

	Genótipos	Média	IC95%	P valor
***CHRNA2* rs2472553**	CC (n=686)	6,43	(6,25 – 6,61)	0,36
	CT + TT (n=213)	6,57	(6,25 – 6,90)	
***CHRNA3* rs1051730**	CC (n=378)	6,32	(6,07 – 6,58)	0,40
	CT + TT (n=521)	6,56	(6,36 – 6,77)	
***CHRNA5* rs16969968**	GG (n=390)	6,36	(6,11 – 6,60)	0,45
	GA + AA (n=509)	6,54	(6,33 – 6,75)	
***CHRNA5* rs2036527**	GG (n=357)	6,27	(6,01 – 6,53)	0,21
	GA + AA (n=542)	6,59	(6,39 – 6,79)	
***CHRNB3* rs6474413**	GG (n=74)	6,54	(5,95 – 7,13)	0,82
	GA + AA (n=825)	6,46	(6,29 – 6,62)	
Alelos de risco ≥5	<5 (n=548)	6,43	(6,23 – 6,63)	0,64
	≥5 (n=351)	6,51	(6,26 – 6,77)	

IC95%=Intervalo de confiança de 95%. Alelos de risco = Somatório dos alelos de risco para a dependência à nicotina (TTAAA) (escala de 0 a 10).

5.5.1 Análise de regressão linear do escore de FTND de acordo com os polimorfismos e alelos de risco

A tabela 6 mostra o escore de FTND em uma análise de regressão linear multivariada para todos os polimorfismos e alelos de risco. Os polimorfismos estudados como também os somatórios dos alelos de risco não apresentaram associação com o escore de FTND em modelos de regressão linear.

Tabela 6 - Modelo de regressão linear para o escore de FTND

Variáveis	Coeficiente β (erro padrão)	P valor
FTND		
Número de alelos variantes para o *CHRNA2* rs2472553	0,09 (0,2)	0,62
Idade	0,002 (0,005)	0,71
Gênero (homem)	-0,01 (0,2)	0,95
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,1 (0,2)	0,48
Escolaridade	0,09 (0,1)	0,38
FTND		
Número de alelos variantes para o *CHRNA3* rs1051730	0,08 (0,1)	0,54
Idade	0,002 (0,005)	0,69
Gênero (homem)	-0,009 (0,2)	0,96
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,1 (0,2)	0,58
Escolaridade	0,09 (0,1)	0,40
FTND		
Número de alelos variantes para o *CHRNA5* rs16969968	0,08 (0,1)	0,52
Idade	0,002 (0,005)	0,71
Gênero (homem)	0,01 (0,2)	0,94
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,1 (0,2)	0,46
Escolaridade	0,08 (0,1)	0,49
FTND		
Número de alelos variantes para o *CHRNA5* rs2036527	0,2 (0,1)	0,18
Idade	0,002 (0,005)	0,72
Gênero (homem)	-0,02 (0,2)	0,91
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,07 (0,2)	0,74
Escolaridade	0,08 (0,1)	0,48
FTND		
Número de alelos variantes para o *CHRNB3* rs6474413	0,02 (0,1)	0,90
Idade	0,003 (0,005)	0,60
Gênero (homem)	-0,05 (0,2)	0,77
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,1 (0,2)	0,59
Escolaridade	0,1 (0,1)	0,31
FTND		
Alelos de risco TTAAA	0,05 (0,04)	0,21
Idade	0,001 (0,005)	0,82
Gênero (homem)	-0,05 (0,2)	0,79
Raça/cor autodeclarada (branca)	0,1 (0,2)	0,58
Escolaridade	0,07 (0,1)	0,52

Números de alelos variantes para o polimorfismo *CHRNA2* rs2472553 foram 0, 1 ou 2 para os genótipos CC, CT, ou TT, respectivamente. Para o polimorfismo C*HRNA3* rs1051730, foram 0, 1 ou 2 para os genótipos CC, CT ou TT, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNA5* rs16969968, foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GA ou AA, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNA5* rs2036527, foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GA ou AA, respectivamente. Para o polimorfismo *CHRNB3* rs6474413, foram 0, 1 ou 2 para os genótipos GG, GA, ou AA, respectivamente. Alelos de risco = Somatório dos alelos de risco para a dependência à nicotina (TTAAA) (escala de 0 a 10) (n=969). FTND = teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (976).

5.6 Taxa de sucesso no processo de cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos e alelos de risco

A tabela 7 mostra a taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos para os polimorfismos *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730,

CHRNA5 rs16969968 e rs2036527, *CHRNB3* rs6474413 e o somatório dos alelos de risco. Os genótipos GA e AA para os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 foram associados a maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo no grupo das mulheres (n=389, n=391); (P=0,03, P=0,01), respectivamente.

Tabela 7 - Taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos e alelos de risco

Grupos de pacientes	***CHRNA2* rs2472553 Taxa de sucesso (%)**			
	CC	**CT**	**TT**	**P valor**
Grupo total (n=737)	44,7	47,5	46,2	0,81
Mulheres (n=395)	40,6	41,2	71,4	0,26
Homens (n=342)	49,4	54,5	16,7	0,19
Grupos de pacientes	***CHRNA3* rs1051730 Taxa de sucesso (%)**			
	CC	**CT**	**TT**	**P valor**
Grupo total (n=742)	44,8	45,6	50,6	0,64
Mulheres (n=396)	36,6	43,5	51,0	0,14
Homens (n=346)	54,3	47,9	50,0	0,52
Grupos de pacientes	***CHRNA5* rs16969968 Taxa de sucesso (%)**			
	GG	**GA**	**AA**	**P valor**
Grupo total (n=731)	43,0	46,6	54,3	0,18
Mulheres (n=389)	35,7	44,0	56,3	0,03
Homens (n=342)	52,0	49,1	51,5	0,87
Grupos de pacientes	***CHRNA5* rs2036527 Taxa de sucesso (%)**			
	GG	**GA**	**AA**	**P valor**
Grupo total (n=734)	43,9	44,4	55,0	0,13
Mulheres (n=391)	34,8	41,5	56,5	0,01
Homens (n=343)	53,8	47,5	52,6	0,53
Grupos de pacientes	***CHRNB3* rs6474413 Taxa de sucesso (%)**			
	GG	**GA**	**AA**	**P valor**
Grupo total (n=727)	46,0	46,0	45,9	1,00
Mulheres (n=388)	41,7	44,4	39,5	0,64
Homens (n=339)	51,9	47,8	52,8	0,67
Grupos de pacientes	**Alelos de risco Taxa de sucesso (%)**			
	<5	**≥5**		**P valor**
Grupo total (n=700)	43,6	48,4		0,21
Mulheres (n=373)	36,2	49,6		0,01
Homens (n=327)	53,0	47,2		0,30

Alelos de risco = Somatório dos alelos de risco para a dependência à nicotina (TTAAA) (escala de 0 a 10)

5.7 Análise de regressão logística multivariada

5.7.1 Análise de regressão logística multivariada para os polimorfismos e alelos de risco

A Tabela 8 mostra uma análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica do grupo de pacientes de acordo com os polimorfismos e alelos de risco. Não foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 8 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso no grupo de pacientes de acordo com os polimorfismos e alelos de risco

Genótipos CT ou TT para o *CHRNA2* rs2472553	**OR**	**IC95%**	**P valor**
Grupo total (n=737)	1,17	0,81-1,69	0,42
Genótipos CT ou TT para o *CHRNA3* rs1051730			
Grupo total (n=742)	1,02	0,75-1,40	0,88
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs16969968			
Grupo total (n=731)	1,20	0,87-1,66	0,26
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs2036527			
Grupo total (n=734)	1,09	0,79-1,50	0,60
Genótipos GA ou AA para o *CHRNB3* rs6474413			
Grupo total (n=727)	1,00	0,57-1,75	1,00
Alelos de risco ≥5			
Grupo total (n=700)	1,08	0,78-1,50	0,66

Regressão logística multivariada com as respectivas variáveis independentes: Gênero (homem), idade, raça/cor autodeclarada (branca), escore de FTND e grupos medicamentosos. Nenhuma das variáveis apresentou significância.

5.7.2 Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 em mulheres e homens

A Tabela 9 mostra uma análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos no gene *CHRNA5* em mulheres. Os genótipos GA ou AA, para o rs16969968 e para o rs2036527, foram associados com maior OR para o sucesso em mulheres (OR=1,63; IC 95%=1,04-2,54; P=0,03), (OR=1,59; IC 95%=1,02-2,48; P=0,04), respectivamente. Foi utilizado um modelo multivariado com inclusão das variáveis: idade, raça/cor, escore de FTND e

grupo medicamentoso. Neste estudo, mulheres apresentaram maior frequência de depressão e ansiedade quando comparadas aos homens (69,0% *vs.* 31,0%, P=0,001; 63,8% *vs.* 36,2%, P=0,03, respectivamente). Diante destas diferenças, as variáveis depressão e/ou ansiedade foram testadas na regressão logística. Estas variáveis não foram associadas ao sucesso terapêutico neste modelo. Além disso, os genótipos GA e AA para os polimorfismos rs16969968 e rs2036527 continuaram significativamente associados.

Tabela 9 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 (n=389) e rs2036527 (n=391) em mulheres

	OR	**IC95%**	**P valor**
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs16969968	1,63	1,04-2,54	0,03
Idade	0,99	0,98-1,01	0,34
Raça/cor autodeclarada (branca)	1,20	0,76-1,91	0,43
Escore de FTND	0,96	0,88-1,05	0,35
Grupo medicamentoso	1,01	0,83-1,25	0,86
	OR	**IC95%**	**P valor**
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs2036527	1,59	1,02-2,48	0,04
Idade	0,99	0,97-1,01	0,33
Raça/cor autodeclarada (branca)	1,28	0,82-2,00	0,29
Escore de FTND	0,97	0,87-1,05	0,44
Grupo medicamentoso	1,01	0,83-1,24	0,93

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

A Tabela 10 mostra uma análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos no gene *CHRNA5* em homens. Os genótipos GA ou AA, para o rs16969968 e rs2036527, não foram associados com OR para o sucesso em homens (OR=0,87; IC 95%=0,55-1,37; P=0,56), (OR=0,75; IC 95%=0,49-1,19; P=0,22), respectivamente; em um modelo multivariado.

Tabela 10 - Análise de regressão logística multivariada para o sucesso na cessação tabágica de acordo com os polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 (n=342) e rs2036527 (n=343) em homens

	OR	IC95%	P valor
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs16969968	0,87	0,55-1,37	0,56
Idade	1,01	0,99-1,04	0,18
Raça/cor autodeclarada (branca)	1,09	0,66-1,79	0,73
Escore de FTND	0,94	0,85-1,03	0,21
Grupo medicamentoso	1,05	0,86-1,28	0,62
	OR	**IC95%**	**P valor**
Genótipos GA ou AA para o *CHRNA5* rs2036527	0,75	0,49-1,19	0,22
Idade	1,01	0,90-1,01	0,21
Raça/cor autodeclarada (branca)	1,11	0,68-1,82	0,69
Escore de FTND	0,95	0,87-1,04	0,26
Grupo medicamentoso	1,06	0,88-1,29	0,53

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

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram as associações dos genótipos GA e AA dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 com o aumento da taxa de sucesso no tratamento antitabagismo, em mulheres. Não foi encontrada associação dos polimorfismos *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNB3* rs6474413 com o nível de dependência à nicotina e com o resultado do tratamento antitabágico.

6.1 Polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB3* e escore de FTND

Diversos estudos identificaram a associação de polimorfismos em genes que codificam receptores acetilcolínicos nicotínicos, subunidades alfa e beta, com FTND e com número de cigarros por dia [46-51]. No entanto, o presente estudo não encontrou resultados significativos de associação dos polimorfismos estudados com FTND, corroborando os achados de estudos anteriores, os quais não encontraram associação dos polimorfismos *CHRNA3* rs1051730, *CHRNA5* rs16969968, *CHRNA5* rs2036527 ou *CHRNA5* rs6474413 com fenótipos relacionados ao tabagismo, incluindo DN [52-56]. Dash *et al* [57] avaliaram os efeitos do polimorfismo *CHRNA2* rs2472553 (troca missense, o qual acarreta substituição de treonina por isoleucina) na função da subunidade α2 do nAChR. Eles mostraram que este pode favorecer a formação de isoformas de receptores de baixa sensibilidade, podendo causar o aumento da susceptibilidade à DN. Wang *et al* [42] avaliaram polimorfismos nos genes *CHRNA2* e *CHRNA6* em 1.730 americanos de descendência européia e 1.892 americanos de descendência africana. Eles reportaram associação do polimorfismo *CHRNA2* rs2472553 com o FTND e com a quantidade de fumo em europeus americanos. No entanto, quando os polimorfismos foram replicados em amostra caso-controle do Estudo da Dependência: Genética e Ambiente (SAGE), o

polimorfismo *CHRNA2* rs2472553, similarmente ao presente estudo, não apresentou qualquer associação com DN.

Os polimorfismos *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNA5* rs16969968, trocas de bases sinônimas e não sinônimas, respectivamente, localizados no éxon 5, foram repetidamente associados com diversos fenótipos para DN de acordo com estudos prévios [46, 47, 49, 58-61]. Em contrapartida e semelhante aos resultados do presente estudo, Erlich *et al* [53], em um estudo com 505 indivíduos, avaliaram a dependência grave à opióides, nicotina e outros fenótipos através de questionários. Cinco polimorfismos em genes que codificam receptores nicotínicos foram testados em uma regressão multivariada de acordo com os fenótipos estudados. Os polimorfismos *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNA5* rs16969968 foram associados com o uso grave de opióides, mas não com os fenótipos relacionados ao tabaco. Eles relataram que o fracasso do estudo em replicar a associação bem validada dos polimorfismos *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNA5* rs16969968 com fenótipos do tabagismo pode ter sido devido a um erro de seleção e/ou mascaramento das amostras (os opióides foram prescritos para todos os indivíduos). Em um estudo de associação, Verde *et al* [54] verificaram a associação de fenótipos relacionados ao fumo, incluindo a DN, com 17 variantes genéticas que incluíam genes codificadores de: metabolizadores de nicotina, receptores nicotínicos, receptores de dopamina, entre outros. Este estudo de coorte que envolveu 126 fumantes (casos) e 80 controles que nunca fumaram, também não encontrou associação significativa para o polimorfismo *CHRNA5* rs16969968.

Quanto aos polimorfismos *CHRNA5* rs2036527 e *CHRNB3* rs6474413, estudos associaram os polimorfismos com DN, escore de FTND e número de cigarros por dia [45, 62, 63].

Entretanto, um estudo caso-controle realizado por Amos *et al* [55], analisaram 34 polimorfismos de nucleotídeo único em afro-americanos, com diversos fenótipos para o tabagismo e o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. O polimorfismo *CHRNA5* rs2036527 foi associado fortemente ao risco de câncer de pulmão, mas não foi significativo para qualquer fenótipo de tabagismo. Etter *et al* [56] avaliaram 9 polimorfismos em genes que codificam as subunidades α4, α5, β2 e β3. A análise foi realizada em 277 participantes com análise de cotinina em 141 fumantes diários. O *CHRNB3* rs6474413 e nenhum dos outros polimorfismos, inclusive o *CHRNA5* rs16969968 não foram associados com DN ou com qualquer outro fenótipo para o fumo. A justificativa encontrada por não terem identificado associação com os fenótipos estudados seria pela metodologia empregada ou pelo pequeno tamanho amostral.

A principal hipótese para os polimorfismos estudados não terem sido associados com o escore de FTND, é pelo fato do intervalo na pontuação do FTND ser pequeno neste grupo de pacientes, pois a maior parte dos pacientes atendidos no PAF foi classificada como tendo moderada ou forte dependência. Outro importante fator é a grande variabilidade genética na população brasileira.

6.2 Escala de conforto PAF

Foram observadas diferenças significativas entre as médias da escala de conforto PAF entre as 2ª, 3ª, 4ª e 5ª consultas dos pacientes nos grupos não sucesso e sucesso. Em ambos os grupos, a média da escala de conforto PAF aumentou gradativamente conforme o seguimento do tratamento. Observou-se que as médias da escala PAF de todas as consultas no grupo não sucesso foi inferior em relação às médias do grupo sucesso; isso demonstra que o grupo não sucesso estava mais desconfortável no tratamento.

6.3 Polimorfismos no gene *CHRNA5* e resultado do tratamento

Neste estudo, os genótipos GA e AA dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 foram associados com o aumento da taxa de sucesso no tratamento antitabagismo, em mulheres. Outros estudos identificaram resultados similares aos do presente estudo [64, 65]. Chen *et al* [64], em dois estudos clínicos randomizados para a cessação do tabagismo, avaliaram o efeito do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968 no desfecho de tratamento com TRN combinado (n=193) e placebo (n=135) e com vareniclina (n=414) e placebo (n=376). Para a abstinência ao final do tratamento foi observada interação entre a combinação de TRN e o polimorfismo *CHRNA5* rs16969968. Eles observaram que os indivíduos com o genótipo AA obtiveram maior taxa de abstinência no tratamento com TRN (60,1%) quando comparado com placebo (31,9%) (OR=3,17, IC95%=1,99–5,05). O grupo tratado com vareniclina apresentou maior frequência de indivíduos abstinentes (53,1%) em relação ao grupo placebo (21,3%) (OR=4,18, IC95%=3,05–5,72); no entanto, este efeito não foi diferente entre os genótipos do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968. Curiosamente, os efeitos genéticos diferiram entre os grupos controles (placebo) nos dois ensaios. Os autores sugeriram que esta diferença entre os ensaios é provavelmente devido à heterogeneidade no desenho do estudo. Dessa forma, eles concluíram que os resultados atuais são intrigantes e sugeriram cautela na investigação dos resultados para a prática clínica.

Sugere-se que o alelo A do rs16969968 pode reduzir os efeitos aversivos à nicotina [65]. Jensen *et al* [65] avaliaram o efeito do polimorfismo *CHRNA5* rs16969968 sobre a resposta aguda à nicotina em americanos de descendência africana e americanos de descendência europeia. Eles seguiram a abstinência à nicotina durante a noite, os participantes completaram o protocolo que incluía: uma dose intravenosa de solução salina e duas doses crescentes de nicotina. Os desfechos avaliados foram: efeitos

aversivos, prazerosos e estimulantes, reatividade cardiovascular, sintomas de abstinência e desempenho cognitivo antes e após a sessão de administração de nicotina. Foi observado que o alelo de risco A para tabagismo pesado foi associado com taxas mais baixas de efeitos aversivos à nicotina. O alelo A do rs16969968 também foi associado com melhora do controle cognitivo após a administração de nicotina. Levando em consideração a diminuição dos efeitos aversivos e a melhora do controle cognitivo em resposta à nicotina, Jensen *et al* sugeriram que o alelo A pode ser importante na tolerabilidade e na resposta aos tratamentos com TRN [65].

Muitos estudos identificaram a associação de polimorfismos no gene *CHRNA5-A3-B4* com cessação do fumo em resposta às terapias de cessação tabágica [58, 66-69]. Em uma meta-análise, Bergen *et al* [70] mostraram que o alelo de menor frequência do rs1051730, o qual está em forte desequilíbrio de ligação com o rs16969968 (concernente com o alelo A), foi associado com maiores taxas de abstinência com TRN (OR=2,54, IC95%= 1,29–4,99) e menores taxas de abstinência no tratamento com placebo (OR=0,31, IC95%= 0,12–0,80). Os autores sugeriram que a prescrição de TRN pode melhorar o desempenho cognitivo nos fumantes em abstinência, mantendo o funcionamento normal do cérebro após parar de fumar, e este efeito pode ser mais forte para indivíduos portadores do alelo de risco do rs1051730. No entanto, os mecanismos de respostas diferenciais não estão elucidados. King *et al* [68], em um estudo clínico, mostraram a associação de alelos de risco no *locus* chr15q25 com menor incidência de náusea. Eles sugeriram que este fato pode ser explicado pela tolerância, pois indivíduos com maior DN têm maior consumo diário de nicotina, mais tolerantes e, consequentemente, possuem menor probabilidade de experimentarem náusea em resposta a um agonista parcial nicotínico como a vareniclina.

Já para o polimorfismo não-sinônimo *CHRNA5* rs16969968, que acarreta substituição de ácido aspártico por asparagina, estudos funcionais *in vitro* mostraram que o rs16969968 codifica receptores nAChR com função reduzida [71, 72]. Kuryatov *et al* [72], em experimento com incorporação do alelo de risco em ovócitos de *Xenopus* expressando nAChRs, observaram o aumento da dessensibilização dos receptores nAChRs $(\alpha4\beta2)_2\alpha5$ em menor período de tempo, além de observarem menor influxo de cálcio, quando comparado aos receptores contendo o alelo protetor. No entanto, este efeito não foi observado nos nAChRs $(\alpha3\beta4)_2\alpha5$ ou $(\alpha3\beta2)_2\alpha5$.

Alguns estudos associaram o alelo de risco A dos polimorfismos *CHRNA5* rs16969968 e rs2036527 com: menor probabilidade de cessação do fumo, menor tempo de abstinência ou não foram associados com desfecho de tratamento [58, 73-78].

A hipótese para o polimorfismo *CHRNA5* rs16969968 ter sido associado com maiores taxas de sucesso no tratamento antitabagismo, em mulheres, pode ser embasada em achados de estudos prévios. Conforme mostrado nos experimentos *in vitro* de Bierut *et al* [71] e Kuryatov *et al* [72], os indivíduos portadores do alelo A podem expressar determinados subtipos de nAChR, compostos pela subunidade α5, com função reduzida. Bergen *et al* [70] mostraram que o alelo de menor frequência do rs1051730, o qual está em forte desequilíbrio de ligação com o rs16969968, foi associado com maiores taxas de abstinência com TRN. Bergen *et al* salientaram que fumantes com redução da função da subunidade α5 e associados com aumento da DN podem ter maior dificuldade para parar de fumar. No entanto, sugeriram que a prescrição de TRN pode melhorar o desempenho cognitivo nos fumantes em abstinência, mantendo o funcionamento normal do cérebro após parar de fumar, e este efeito pode ser mais forte para indivíduos portadores do alelo de risco do rs1051730. Semelhantemente, Chen *et al* [64] observaram que os indivíduos com o genótipo AA para o rs16969968 obtiveram maior taxa de

abstinência no tratamento com TRN. No estudo de Jensen *et al* [65], o alelo A foi associado com taxas mais baixas de efeitos aversivos à nicotina e também com melhora do controle cognitivo. Jensen *et al* sugeriram que o alelo A pode ser importante na tolerabilidade e na resposta aos tratamentos com TRN. Acrescentaram que, notavelmente, a subunidade α5 tem função essencial em mediar os efeitos aversivos à nicotina. Interessantemente, King *et al* [68] mostraram a associação de alelos de risco no *locus* chr15q25 com menor incidência de náusea. Os autores sugeriram que este fato pode ser explicado pela tolerância, pois indivíduos com maior DN têm maior consumo diário de nicotina, são mais tolerantes e, consequentemente, possuem menor probabilidade de experimentarem náusea em resposta a um agonista parcial nicotínico, como a vareniclina. Portanto, a redução da função da subunidade α5, a maior tolerabilidade à TRN e à vareniclina e a melhora do controle cognitivo, podem ser possíveis explicações para a associação do rs16969968 com o sucesso neste estudo. Ainda, o rs16969968 pode estar em considerável desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais, que poderiam ser envolvidos no processo de cessação tabágica e/ou nos mecanismos de resposta à TRN.

Foi observada maior frequência de depressão e/ou ansiedade no grupo das mulheres, o que de acordo com alguns estudos poderia diminuir as taxas de sucesso no tratamento antitabágico [79-83]. Zawertailo *et al* [79], realizaram um estudo com 13.000 fumantes e verificaram que, indivíduos com depressão recorrente foram significativamente menos propensos a parar de fumar em comparação com aqueles sem histórico de depressão. Goodwin *et al* [80], encontraram que os aumentos nos ataques de pânico e o transtorno de ansiedade social foram mais propensos em mulheres fumantes do que em homens fumantes. Stepankova *et al* [81], em um estudo com 1.730 fumantes, 289 tinham histórico de depressão. A taxa de abstinência do fumo em 1 ano foi de

32,5% para os fumantes com histórico de depressão e 38,7% para aqueles sem história (P = 0,048). No presente estudo, as variáveis depressão e/ou ansiedade não foram associadas ao resultado do tratamento e os polimorfismos rs16969968 e rs2036527 continuaram significativamente associados, em um modelo multivariado.

6.4 Polimorfismos nos genes *CHRNA2, CHRNA3, CHRNB3* e desfecho do tratamento

No presente estudo, não foram encontradas associações dos polimorfismos *CHRNA2* rs2472553, *CHRNA3* rs1051730 e *CHRNB3* rs6474413 com desfecho de tratamento. Os resultados deste estudo corroboram os achados de estudos prévios. Ruyck *et al* [84] e Sarginson *et al* [58] não encontraram associações para o rs1051730 com desfecho de tratamento. No entanto, Munafo *et al* [69] identificaram associação do alelo T com a diminuição da probabilidade de cessação do fumo. Bergen *et al* [70]associaram o alelo T com maiores taxas de abstinência com TRN e menores taxas de abstinência no tratamento com placebo.

6.5 Limitações do estudo

Há algumas limitações neste estudo. Primeira, a maior parte dos pacientes atendidos no PAF foi classificada como dependente moderado ou altamente dependente, o que pode ter prejudicado a análise de associação entre os genótipos e o escore FTND. Segundo, foram utilizados modelos multivariados com as variáveis disponíveis, nos quais não foi possível adicionar outros fatores ambientais que poderiam ser importantes, tais como a funcionalidade dos receptores e motivação em parar de fumar.

7 CONCLUSÕES

Não foram encontradas associações significativas dos polimorfismos estudados com o nível de dependência à nicotina.

Os polimorfismos rs16969968 e rs2036527 no gene *CHRNA5* foram associados com maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo no grupo das mulheres. Estes resultados podem contribuir com avanços na terapêutica baseada em medicina personalizada.

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 do efeito de polimorfismos genéticos com a dependência à nicotina**

PESQUISADOR :**Dr. Alexandre da Costa Pereira**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico Assitente, Médico Pesquisador – InCor – HCFMUSP**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **97329**

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	□
RISCO BAIXO	□	RISCO MAIOR	□

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : **2 anos**

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

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 ao tratamento antitabagismo, associar o efeito das alterações no DNA (polimorfismos) com a dependência à nicotina, e também avaliar a interação desses polimorfismos com o resultado do tratamento antitabágico. Neste projeto vamos estudar o seu material genético (o DNA). O objetivo do estudo é saber por que algumas pessoas apresentam uma maior dificuldade em parar de fumar do que outras, e se realmente os fatores genéticos podem influenciar em um maior ou menor nível de dependência à nicotina.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: cappesq@hcnet.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.

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

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 do efeito de polimorfismos genéticos com a dependência à nicotina".**

Eu discuti com o Dr. Alexandre da Costa Pereira 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 responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Hospital das Clínicas da FMUSP 4024/14/004

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COM A DEPENDÊNCIA À NICOTINA
Pesquisador Responsável: Alexandre da Costa Pereira **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Paulo Roberto Xavier Tomaz **CAAE:** 27740614.2.0000.0068
Coautores: Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos, Dr. José Eduardo Krieger, Dra. Jaqueline Scholz Issa, Dr. Alexandre da Costa Pereira.
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Orientador: Dr. Paulo Caleb Júnior de Lima Santos
Instituição: HCFMUSP
Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11654

Número do Parecer: 689.759

Data da Relatoria: 18/06/14

Apresentação do Projeto: Trata-se de estudo para avaliar os polimorfismos dos genes ANKK1, COMT, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB3 e CHRNB4 com o nível de dependência em fumantes submetidos a tratamento medicamentoso para coibir a dependência, e com a resposta à intervenção medicamentosa.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar os polimorfismos dos genes ANKK1, COMT, CHRNA3, CHRNA5, CHRNB3 e CHRNB4 com o nível de dependência em fumantes submetidos a tratamento medicamentoso para coibir a dependência, e com a resposta à intervenção medicamentosa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O estudo não impõe riscos expressivos aos pacientes. Os benefícios não serão diretos, mas poderão contribuir para o melhor entendimento da dependência à nicotina em nossa população, bem como a resposta ao tratamento medicamentoso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é de interesse para o estudo dessa doença.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequados.

Recomendações: Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Pela aprovação.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 18 de Junho de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

COMISSÃO CIENTIFICA
RECEBIDO
27/06/14
fabiana

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

9 REFERÊNCIAS

1. Hiilamo H, Glantz SA. Implementation of effective cigarette health warning labels among low and middle income countries: state capacity, path-dependency and tobacco industry activity. *Soc Sci Med.* 2015;124:241-245.

2. Tomioka H, Sekiya R, Nishio C, Ishimoto G. Impact of smoking cessation therapy on health-related quality of life. *BMJ Open Respir Res.* 2014;1(1):e000047.

3. A clinical practice guideline for treating tobacco use and dependence: 2008 update. A U.S. Public Health Service report. *Am J Prev Med.* 2008;35(2):158-176.

4. Pine-Abata H, McNeill A, Murray R, Bitton A, Rigotti N, Raw M. A survey of tobacco dependence treatment services in 121 countries. *Addiction.* 2013;108(8):1476-1484.

5. 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.*311(2):183-192.

6. IBGE. Pesquisa especial de tabagismo (PEtab). In: Diretoria de Pesquisas CdTeR, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, ed; 2008.

7. Henningfield JE, Slade J. Tobacco-dependence medications: public health and regulatory issues. *Food Drug Law J.* 1998;53 suppl:75-114.

8. 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.

9. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addition. *N Engl J Med.* 1988;319(20):1318-1330.

10. 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):673-681.

11. Leonard S, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res.* 2001;3(3):203-223.

12. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):217-238.

13. Fiore MCB, W.C.; Cohen, S.J.; Dorfman, S.F.; Goldstein, M.G.; Gritz, E.R.; et al. Treating Tobacco Use and Dependence. Clinical Practice Guideline. In: Rockville MUSDoHaHS, Public Health Service, ed; 2000.

14. Fiore MCJ, C.R.; Baker, T.B.,; Bailey, W.C.; Benowitz, N.L.; Curry, S.J.; et al. Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update. Clinical Practice Guideline. In: Rockville MUSDoHaHSPHS, ed; 2008.

15. Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI. Bupropion is a nicotinic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(1):321-327.

16. 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.

17. 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):453-463.

18. 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 11C-nicotine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(11):5190-5195.

19. 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):907-915.

20. GILMAN. G. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 10 ed. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2005.

21. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med.* 1986;37:21-32.

22. Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):79-115.

23. Hiroi N, Scott D. Constitutional mechanisms of vulnerability and resilience to nicotine dependence. *Mol Psychiatry.* 2009;14(7):653-667.

24. Huang CL, Lin HH, Wang HH. Evaluating screening performances of the Fagerstrom tolerance questionnaire, the Fagerstrom test for nicotine dependence and the heavy smoking index among Taiwanese male smokers. *J Clin Nurs.* 2008;17(7):884-890.

25. Piper ME, McCarthy DE, Baker TB. Assessing tobacco dependence: a guide to measure evaluation and selection. *Nicotine Tob Res.* 2006;8(3):339-351.

26. Fagerstrom KO, Heatherton TF, Kozlowski LT. Nicotine addiction and its assessment. *Ear Nose Throat J.* 1990;69(11):763-765.

27. Issa JS. A new nicotine dependence score and a new scale assessing patient comfort during smoking cessation treatment. *J Bras Pneumol.* 2012;38(6):761-765.

28. Association. AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV-TR. In: Association. AP, ed. Washington, DC; 2000.

29. OMS. CID - 10 - Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados a saúde. In: Paulo EdUdS, ed. São Paulo; 1997.

30. Hughes JR, Benowitz N, Hatsukami D, Mermelstein RJ, Shiffman S. Clarification of SRNT workgroup guidelines for measures in clinical trials of smoking cessation therapies. *Nicotine Tob Res.* 2004;6(5):863-864.

31. Horimoto AR, Oliveira CM, Giolo SR, Soler JP, de Andrade M, Krieger JE, Pereira AC. Genetic analyses of smoking initiation, persistence, quantity, and age-at-onset of regular cigarette use in Brazilian families: the Baependi Heart Study. *BMC Med Genet.* 2012;13:9.

32. Sieminska A, Jassem E, Kita-Milczarska K. Nicotine dependence in an isolated population of Kashubians from North Poland: a population survey. *BMC Public Health.* 2015;15:80.

33. True WR, Heath AC, Scherrer JF, Waterman B, Goldberg J, Lin N, Eisen SA, Lyons MJ, Tsuang MT. Genetic and environmental contributions to smoking. *Addiction.* 1997;92(10):1277-1287.

34. Ho MK, Tyndale RF. Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(2):81-98.

35. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau O, Swan GE, Goate AM, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, Fugman D, Martin NG, Montgomery GW, Wang JC, Ballinger DG, Rice JP, Bierut LJ. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet.* 2007;16(1):36-49.

36. Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, Swan GE, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, Fugman D, Goate AM, Hinrichs AL, Konvicka K, Martin NG, Montgomery GW, Saccone NL, Saccone SF, Wang JC, Chase GA, Rice JP, Ballinger DG. Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet.* 2007;16(1):24-35.

37. Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, Chen C, Jacobs K, Wheeler W, Landi MT, Ziegler RG, Hunter DJ, Chanock S, Hankinson S, Kraft P, Bergen AW. Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One.* 2009;4(2):e4653.

38. Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, Thun MJ, Goate A, Calle EE. Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(12):3517-3525.

39. 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):485-487.

40. 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.* 2013;15(6):1146-1150.

41. 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.

42. Wang S, A DvdV, Xu Q, Seneviratne C, Pomerleau OF, Pomerleau CS, Payne TJ, Ma JZ, Li MD. Significant associations of CHRNA2 and CHRNA6 with nicotine dependence in European American and African American populations. *Hum Genet.* 2014;133(5):575-586.

43. Bandiera FC, Ross KC, Taghavi S, Delucchi K, Tyndale RF, Benowitz NL. Nicotine Dependence, Nicotine Metabolism, and the Extent of Compensation in Response to Reduced Nicotine Content Cigarettes. *Nicotine Tob Res.* 2015;17(9):1167-1172.

44. Hubacek JA, Lanska V, Adamkova V. Lack of an association between SNPs within the cholinergic receptor genes and smoking behavior in a Czech post-MONICA study. *Genet Mol Biol.* 2014;37(4):625-630.

45. Broms U, Wedenoja J, Largeau MR, Korhonen T, Pitkaniemi J, Keskitalo-Vuokko K, Happola A, Heikkila KH, Heikkila K, Ripatti S, Sarin AP, Salminen O, Paunio T, Pergadia ML, Madden PA, Kaprio J, Loukola A. Analysis of detailed phenotype profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res.* 2012;14(6):720-733.

46. Kim DK, Hersh CP, Washko GR, Hokanson JE, Lynch DA, Newell JD, Murphy JR, Crapo JD, Silverman EK. Epidemiology, radiology, and genetics of nicotine dependence in COPD. *Respir Res.* 2011;12:9.

47. Kaur-Knudsen D, Nordestgaard BG, Bojesen SE. CHRNA3 genotype, nicotine dependence, lung function and disease in the general population. *Eur Respir J.* 2012;40(6):1538-1544.

48. Petrovsky N, Ettinger U, Kessler H, Mossner R, Wolfsgruber S, Dahmen N, Maier W, Wagner M, Quednow BB. The effect of nicotine on sensorimotor gating is modulated by a CHRNA3 polymorphism. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;229(1):31-40.

49. Wen L, Jiang K, Yuan W, Cui W, Li MD. Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol.* 2014.

50. Buczkowski K, Sieminska A, Linkowska K, Czachowski S, Przybylski G, Jassem E, Grzybowski T. Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and several nicotine dependence traits in Polish population: a case-control study. *Biomed Res Int.*2015:350348.

51. Wassenaar CA, Dong Q, Wei Q, Amos CI, Spitz MR, Tyndale RF. Relationship between CYP2A6 and CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4 variation and smoking behaviors and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(17):1342-1346.

52. Robinson JD, Versace F, Lam CY, Minnix JA, Engelmann JM, Cui Y, Karam-Hage M, Shete SS, Tomlinson GE, Chen TT, Wetter DW, Green CE, Cinciripini PM. The CHRNA3 rs578776 Variant is Associated with an Intrinsic Reward Sensitivity Deficit in Smokers. *Front Psychiatry.* 2013;4:114.

53. Erlich PM, Hoffman SN, Rukstalis M, Han JJ, Chu X, Linda Kao WH, Gerhard GS, Stewart WF, Boscarino JA. Nicotinic acetylcholine receptor genes on chromosome 15q25.1 are associated with nicotine and opioid dependence severity. *Hum Genet.* 2010;128(5):491-499.

54. 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.* 2011;6(10):e26668.

55. Amos CI, Gorlov IP, Dong Q, Wu X, Zhang H, Lu EY, Scheet P, Greisinger AJ, Mills GB, Spitz MR. Nicotinic acetylcholine receptor region on chromosome 15q25 and lung cancer risk among African Americans: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(15):1199-1205.

56. 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):772-775.

57. Dash B, Lukas RJ, Li MD. A signal peptide missense mutation associated with nicotine dependence alters alpha2*-nicotinic acetylcholine receptor function. *Neuropharmacology.* 2014;79:715-725.

58. Sarginson JE, Killen JD, Lazzeroni LC, Fortmann SP, Ryan HS, Schatzberg AF, Murphy GM, Jr. Markers in the 15q24 nicotinic receptor subunit gene cluster (CHRNA5-A3-B4) predict severity of nicotine addiction and response to smoking cessation therapy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156B(3):275-284.

59. Gabrielsen ME, Romundstad P, Langhammer A, Krokan HE, Skorpen F. Association between a 15q25 gene variant, nicotine-related habits, lung cancer and COPD among 56,307 individuals from the HUNT study in Norway. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(11):1293-1299.

60. Conlon MS, Bewick MA. Single nucleotide polymorphisms in CHRNA5 rs16969968, CHRNA3 rs578776, and LOC123688 rs8034191 are associated with heaviness of smoking in women in Northeastern Ontario, Canada. *Nicotine Tob Res.* 2011;13(11):1076-1083.

61. Hong LE, Yang X, Wonodi I, Hodgkinson CA, Goldman D, Stine OC, Stein ES, Thaker GK. A CHRNA5 allele related to nicotine addiction and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2011;10(5):530-535.

62. David SP, Hamidovic A, Chen GK, Bergen AW, Wessel J, Kasberger JL, Brown WM, Petruzella S, Thacker EL, Kim Y, Nalls MA, Tranah GJ, Sung YJ, Ambrosone CB, Arnett D, Bandera EV, Becker DM, Becker L, Berndt SI, Bernstein L, Blot WJ, Broeckel U, Buxbaum SG, Caporaso N, Casey G, Chanock SJ, Deming SL, Diver WR, Eaton CB, Evans DS, Evans MK, Fornage M, Franceschini N, Harris TB, Henderson BE, Hernandez DG, Hitsman B, Hu JJ, Hunt SC, Ingles SA, John EM, Kittles R, Kolb S, Kolonel LN, Le Marchand L, Liu Y, Lohman KK, McKnight B, Millikan RC, Murphy A, Neslund-Dudas C, Nyante S, Press M, Psaty BM, Rao DC, Redline S, Rodriguez-Gil JL, Rybicki BA, Signorello LB, Singleton AB, Smoller J, Snively B, Spring B, Stanford JL, Strom SS, Swan GE, Taylor KD, Thun MJ, Wilson AF, Witte JS, Yamamura Y, Yanek LR, Yu K, Zheng W, Ziegler RG, Zonderman AB, Jorgenson E, Haiman CA, Furberg H. Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in African Americans. *Transl Psychiatry.* 2012;2:e119.

63. Kamens HM, Miyamoto J, Powers MS, Ro K, Soto M, Cox R, Stitzel JA, Ehringer MA. The beta3 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor: Modulation of gene expression and nicotine consumption. *Neuropharmacology.* 2015;99:639-649.

64. Chen LS, Baker TB, Jorenby D, Piper M, Saccone N, Johnson E, Breslau N, Hatsukami D, Carney RM, Bierut LJ. Genetic variation (CHRNA5), medication (combination nicotine replacement therapy vs. varenicline), and smoking cessation. *Drug Alcohol Depend.* 2015;154:278-282.

65. Jensen KP, DeVito EE, Herman AI, Valentine GW, Gelernter J, Sofuoglu M. A CHRNA5 Smoking Risk Variant Decreases the Aversive Effects of Nicotine in Humans. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40(12):2813-2821.

66. Baker TB, Weiss RB, Bolt D, von Niederhausern A, Fiore MC, Dunn DM, Piper ME, Matsunami N, Smith SS, Coon H, McMahon WM, Scholand MB, Singh N, Hoidal JR, Kim SY, Leppert MF, Cannon DS. Human neuronal acetylcholine receptor A5-A3-B4 haplotypes are associated with multiple nicotine dependence phenotypes. *Nicotine Tob Res.* 2009;11(7):785-796.

67. Freathy RM, Ring SM, Shields B, Galobardes B, Knight B, Weedon MN, Smith GD, Frayling TM, Hattersley AT. A common genetic variant in the 15q24 nicotinic acetylcholine receptor gene cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNB4) is associated with a reduced ability of women to quit smoking in pregnancy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(15):2922-2927.

68. 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):641-650.

69. Munafo MR, Johnstone EC, Walther D, Uhl GR, Murphy MF, Aveyard P. CHRNA3 rs1051730 genotype and short-term smoking cessation. *Nicotine Tob Res.* 2011;13(10):982-988.

70. Bergen AW, Javitz HS, Krasnow R, Nishita D, Michel M, Conti DV, Liu J, Lee W, Edlund CK, Hall S, Kwok PY, Benowitz NL, Baker TB, Tyndale RF, Lerman C, Swan GE. Nicotinic acetylcholine receptor variation and response to smoking cessation therapies. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(2):94-103.

71. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, Horton WJ, Breslau N, Budde J, Cloninger CR, Dick DM, Foroud T, Hatsukami D, Hesselbrock V, Johnson EO, Kramer J, Kuperman S, Madden PA, Mayo K, Nurnberger J, Jr., Pomerleau O, Porjesz B, Reyes O, Schuckit M, Swan G, Tischfield JA, Edenberg HJ, Rice JP, Goate AM. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry.* 2008;165(9):1163-1171.

72. Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J. Acetylcholine receptor (AChR) alpha5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (alpha4beta2)(2)alpha5 AChR function. *Mol Pharmacol.* 2011;79(1):119-125.

73. Chen LS, Baker TB, Piper ME, Smith SS, Gu C, Grucza RA, Smith GD, Munafo M, Bierut LJ. Interplay of genetic risk (CHRNA5) and environmental risk (partner smoking) on cigarette smoking reduction. *Drug Alcohol Depend.* 2014;143:36-43.

74. Chen LS, Bach RG, Lenzini PA, Spertus JA, Bierut LJ, Cresci S. CHRNA5 variant predicts smoking cessation in patients with acute myocardial infarction. *Nicotine Tob Res.* 2014;16(9):1224-1231.

75. Zhu AZ, Zhou Q, Cox LS, David SP, Ahluwalia JS, Benowitz NL, Tyndale RF. Association of CHRNA5-A3-B4 SNP rs2036527 with smoking cessation therapy response in African-American smokers. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(2):256-265.

76. Chen LS, Hung RJ, Baker T, Horton A, Culverhouse R, Saccone N, Cheng I, Deng B, Han Y, Hansen HM, Horsman J, Kim C, Lutz S, Rosenberger A, Aben KK, Andrew AS, Breslau N, Chang SC, Dieffenbach AK, Dienemann H, Frederiksen B, Han J, Hatsukami DK, Johnson EO, Pande M, Wrensch MR, McLaughlin J, Skaug V, van der Heijden HF, Wampfler J, Wenzlaff A, Woll P, Zienolddiny S, Bickeboller H, Brenner H, Duell EJ, Haugen A, Heinrich J, Hokanson JE, Hunter DJ, Kiemeney LA, Lazarus P, Le Marchand L, Liu G, Mayordomo J, Risch A, Schwartz AG, Teare D, Wu X, Wiencke JK, Yang P, Zhang ZF, Spitz MR, Kraft P, Amos CI, Bierut LJ. CHRNA5 risk variant predicts delayed smoking cessation and earlier lung cancer diagnosis--a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(5).

77. Leung T, Bergen A, Munafo MR, De Ruyck K, Selby P, De Luca V. Effect of the rs1051730-rs16969968 variant and smoking cessation treatment: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2015;16(7):713-720.

78. Tyndale RF, Zhu AZ, George TP, Cinciripini P, Hawk LW, Jr., Schnoll RA, Swan GE, Benowitz NL, Heitjan DF, Lerman C. Lack of Associations of CHRNA5-A3-B4 Genetic Variants with Smoking Cessation Treatment Outcomes in Caucasian Smokers despite Associations with Baseline Smoking. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128109.

79. Zawertailo L, Voci S, Selby P. Depression status as a predictor of quit success in a real-world effectiveness study of nicotine replacement therapy. *Psychiatry Res.* 2015;226(1):120-127.

80. Goodwin RD, Wall MM, Choo T, Galea S, Horowitz J, Nomura Y, Zvolensky MJ, Hasin DS. Changes in the prevalence of mood and anxiety disorders among male and female current smokers in the United States: 1990-2001. *Ann Epidemiol.* 2014;24(7):493-497.

81. Stepankova L, Kralikova E, Zvolska K, Kmetova A, Blaha M, Bortlicek Z, Sticha M, Anders M, Schroeder DR, Croghan IT. Tobacco treatment outcomes in patients with and without a history of depression, Czech Republic, 2005-2010. *Prev Chronic Dis.*10:E158.

82. Scott WD, Beevers CG, Mermelstein RJ. Depression vulnerable and nonvulnerable smokers after a failure experience: examining cognitive self-regulation and motivation. *Behav Modif.* 2008;32(4):519-539.

83. Covey LS, Glassman AH, Stetner F. Depression and depressive symptoms in smoking cessation. *Compr Psychiatry.* 1990;31(4):350-354.

84. De Ruyck K, Nackaerts K, Beels L, Werbrouck J, De Volder A, Meysman M, Salhi B, Van Meerbeeck J, Thierens H. Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. *Pharmacogenomics.* 2010;11(8):1053-1063.

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.

APÊNDICE 3 - Escala de conforto PAF

1. Qual a frequência da fissura?	Pontuação
Nenhuma	3
Nem todos os dias	2
Algumas vezes ao dia	1
Muitas vezes no dia	0
2. Atualmente a intensidade de irritabilidade e raiva comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0
3. Atualmente a intensidade da ansiedade e tensão comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0
4. Atualmente a intensidade da impaciência e inquietação comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0
5. Atualmente a presença de humor depressivo comparado a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0
6. Atualmente a intensidade da dificuldade de concentração comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0

7. Atualmente a intensidade da alteração do apetite em comparação a quando fumava é	Pontuação
Inalterado	3
Aumento leve	2
Aumento moderado	1
Aumento intenso	0
Inapetente	0
8. Atualmente a intensidade da insônia comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0

9. Atualmente a intensidade da sonolência diurna comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0
10. Atualmente a intensidade da dor de cabeça comparada a quando fumava é	Pontuação
Menor que quando fumava	4
Não mudou ou não tenho	3
Levemente maior	2
Moderadamente maior	1
Muito maior	0

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.