PAULO ROBERTO XAVIER TOMAZ

Avaliações farmacogenética e da relação de metabólitos da nicotina em pacientes tratados com fármacos antitabagismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

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

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2022

PAULO ROBERTO XAVIER TOMAZ

Avaliações farmacogenética e da relação de metabólitos da nicotina em pacientes tratados com fármacos antitabagismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo

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

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2022

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
Avaliações farmacogenética e da relação de metabólitos da nicotina em pacientes tratados com fármacos antitabagismo / Paulo Roberto Xavier Tomaz. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--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.Vareniclina 2.Bupropiona 3.Farmacogenética 4.Abandonar o hábito de fumar 5.Polimorfismo genético 6.Citocromo P-450 CYP2B6 7.Citocromo P-450 CYP2A6 8.Nicotina 9.Cotinina

USP/FM/DBD-128/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: TOMAZ, Paulo Roberto Xavier

Título: Avaliações farmacogenética e da relação de metabólitos da nicotina em pacientes tratados com fármacos antitabagismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, por sempre guiarem e iluminarem os meus passos.

Aos meus pais Marilucia e Roberto, meu irmão Vinícius e a minha avó Maria Luiza, por sempre me apoiarem e incentivarem, por estarem comigo em todos os momentos. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Paulo Caleb;
Paulo, obrigado por ter sido o melhor orientador, mestre e amigo durante toda a minha jornada de iniciação científica, mestrado e doutorado. Serei eternamente grato por toda a parceria e aprendizado durante todos esses anos.

À minha grande amiga doutora, Juliana Rocha;
Ju, a sua amizade e parceria sem dúvida alguma, foram um dos melhores presentes que já recebi, obrigado por todos os momentos, conquistas, conhecimentos e momentos divertidos que já vivenciamos. Você é incrível!

Aos Doutores Alexandre Pereira, Jaqueline Scholz, Patrícia Gaya, Tânia Ogawa e Regina;
Obrigado pelas dicas, instruções e sugestões. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Jaque, Paty, Tânia e Regina, parabéns e obrigado pelo trabalho de vocês no ambulatório, não teríamos conseguido sem uma equipe tão comprometida e parceira como vocês!

Aos meus amigos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular e do Laboratório de Farmacologia Clínica e Pesquisa Translacional da Unifesp: Leiliane, Emanuelle, Thuane, Aline Morgan, Mariana, Fábio, Bruna, Gabriela Venturini, Pamela, Tamiris, Kalliandra, Michelle Sabrina, Lígia, Gabriele Darezzo, Théo, Maurício, Isabela, Mariliza, Renata Carmona, Ana Piesco, Ednalva, Andréia e Márcio;
Muito obrigado pela parceria, trocas, conhecimento e momentos juntos!

Aos doutores Eduardo Costa de Figueiredo, Henrique Dipe Faria e Isarita Martins do LATF (Unifal, MG);
Muito obrigado pela colaboração neste trabalho, pelo conhecimento, sugestões e melhorias aplicadas.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger e ao LGCM (FMUSP)
Obrigado por disponibilizar os materiais, reagentes, equipamentos e toda a infraestrutura necessária para a realização deste projeto.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora
Muito obrigado pelo comprometimento, sugestões e melhorias.

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 o que me ensinaram. Vocês são os melhores! Amo cada um, infinitamente!

À CAPES, à FAPESP e ao CNPQ
Agradeço o apoio financeiro para a execução desse trabalho.

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é CORAGEM."
Guimarães Rosa

RESUMO

Tomaz PRX. Avaliações farmacogenética e da relação de metabólitos da nicotina em pacientes tratados com fármacos antitabagismo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O tabagismo ainda é um problema de saúde pública global e representa a maior causa de mortes evitáveis. Apenas cerca de um terço dos pacientes tem sucesso no tratamento farmacológico antitabágico e por esse motivo avanços são cada vez mais necessários para tornar esse tratamento mais efetivo. Recentes estudos demonstraram que o uso de estratégias que permitem o tratamento mais individualizado, tais como a identificação de polimorfismos genéticos e a quantificação da relação de metabólitos da nicotina (RMN), podem ser capazes de aumentar a taxa de sucesso desses pacientes. Nesse contexto, o presente estudo tem os objetivos de avaliar a possível associação dos polimorfismos rs1801272, rs2839943 *(CYP2A6)* e rs8109525 *(CYP2B6)* com a taxa de sucesso no tratamento antitabágico com vareniclina; quantificar a RMN de pacientes que irão iniciar o tratamento farmacológico antitabágico e identificar possíveis associações com o desfecho do tratamento e com características gerais dos pacientes. Para a avalição farmacogenética, foram incluídos 167 pacientes que concluíram o tratamento com vareniclina, com ou sem sucesso, provenientes do Programa de Assistência ao Fumante (PAF) do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. Os polimorfismos foram genotipados com a tecnologia de PCR em tempo real utilizando a plataforma TaqMan®. Para a avaliação da RMN, foram incluídos 185 pacientes provenientes do PAF, que ainda iriam iniciar o tratamento farmacológico. Tais pacientes foram acompanhados de forma prospectiva para a avaliação do desfecho do tratamento. A razão trans-*3'*-hidroxicotinina/cotinina (3HC/CO) foi obtida a partir da dosagem de ambos os metabólitos, em amostras de soro, através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Dos pacientes incluídos para a análise farmacogenética, identificamos que aqueles com genótipos AG ou GG, para o rs8109525, foram associados com maior OR para o sucesso no tratamento antitabágico com vareniclina, quando comparado ao grupo com genótipo AA (OR = 2,01; IC 95% = 1,01 - 4,00; p = 0,047). Dos pacientes incluídos na avaliação da RMN, 29,7% foram considerados metabolizadores lentos e 70,3% normais/rápidos. As médias de metabólitos foram associadas ao número de cigarros fumados por dia (p < 0,001 para cotinina e 0,023 para hidroxicotinina). No entanto, não foram encontradas associações significativas entre a RNM e o desfecho do tratamento ou características gerais dos pacientes. Destacamos que este estudo pode contribuir para a indicação de estratégias que possam fazer parte da customização de tratamentos e, consequentemente, melhorar as taxas de sucesso no processo de cessação do tabagismo.

Palavras-chave: Vareniclina. Bupropiona. Farmacogenética. Abandonar o hábito de fumar. Polimorfismo genético. Citocromo P-450 *CYP2B6.* Citocromo P-450 *CYP2A6.* Nicotina. Cotinina.

ABSTRACT

Tomaz PRX. Evaluations of the pharmacogenetics and relation of nicotine metabolites in patients treated with smoking cessation drugs [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Tobacco use is still a global public health problem and represents the biggest cause of preventable deaths. Only about a third of patients are successful in anti-smoking pharmacological treatment and for this reason, advances are increasingly necessary to make this treatment more assertive. Recent studies have shown that the use of strategies that allow more individualized treatment, such as the identification of genetic polymorphisms and the quantification of the nicotine metabolite ratio (NMR), may be able to increase the success rate of these patients. In this context, the present study aims to evaluate the possible association of polymorphisms rs1801272, rs2839943 (*CYP2A6*) and rs8109525 (*CYP2B6*) with the success rate in anti-smoking treatment with varenicline; to quantify the NMR of patients who will start anti-smoking pharmacological treatment and to identify possible associations with the treatment outcome and with general characteristics of the patients. For the pharmacogenetics analyses, 167 patients who successfully or unsuccessfully completed vareniclin treatment from the Smoker Assistance Program (SAP) of the Instituto do Coração from Hospital das Clínicas/University of São Paulo, Brazil, were included. Polymorphisms were genotyped with real-time PCR technology using the TaqMan® platform. For the NMR analyses, 185 patients from the SAP who had not yet started treatment were included. These patients were prospectively followed up for treatment outcome assessment. The trans-3'-hydroxycotinine/cotinine ratio (3HC/CO) was obtained from the dosage of both metabolites, in serum samples, using liquid-chromatography tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS) instrumentation. From patients enrolled for pharmacogenetics analyses, we identified that those with AG or GG genotypes, for rs8109525, were associated with a higher OR for success in anti-smoking treatment with varenicline, when compared to the AA genotype group (OR = 2.01; CI 95 % = 1.01 - 4.00; p = 0.047). From patients enrolled in the NMR assessment, 70.3% were classified as normal or fast metabolizers and 29.7% as slow metabolizers. The metabolite averages were associated with the number of cigarettes smoked per day ($p < 0.001$ for cotinine and 0.023 hydroxycotinine). However, we were unable to analyze the association of the NMR with general and clinical characteristics of patients under anti-smoking treatment. We emphasize that this study can contribute to the indication of strategies that can be part of the customization of treatments and, consequently, improve the success rate in the smoking cessation process.

Keywords: Varenicline. Bupropion. Pharmacogenetics. Smoking cessation. Polymorphism, genetic. Cytochrome P-450 CYP2B6. Cytochrome P-450 CYP2A6. Nicotine. Cotinine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos polimorfismos analisados..... 30

Tabela 2 - Gradiente cromatográfico utilizado incluindo o fluxo utilizado e a respectiva porcentagem de fases móveis A e B utilizadas ao longo da corrida cromatográfica. 35

Tabela 3 - Transições MRM e condições experimentais para a detecção de todos os analitos e padrão interno 35

Tabela 4 - Valores dos controles baixo, médios e alto utilizados no método para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em soro. 37

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo (n = 167) 40

Tabela 6 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo CYP2B6 (rs8109525) 41

Tabela 7 - Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg 42

Tabela 8 - Taxa de sucesso de acordo com os genótipos..... 42

Tabela 9 - Análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n = 167) para o CYP2A6 rs1801272 e rs28399433 43

Tabela 10 - Análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n = 167) para o CYP2B6 rs8109525 43

Tabela 11 - Resultado do ensaio de linearidade para os analitos de COT e 3HC.... 44

Tabela 12 - Resultados do ensaio de precisão intra e inter-dia para todos os níveis de controle de qualidade dos analitos de interesse, expressos como porcentagem do desvio padrão relativo (%CV) 45

Tabela 13 - Resultados da exatidão do método desenvolvido para a determinação de COT e 3HC em amostras de soro para todos os níveis de controle de qualidade do analito e seus respectivos valores expressos em porcentagem (%) 46

Tabela 14 - Características gerais conforme a RMN. 47

Tabela 15 - Concentração de metabólitos da nicotina conforme o desfecho do tratamento antitabágico 48

Tabela 16 - Concentração dos analitos conforme o desfecho de tratamento e fármacos antitabágicos 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HC	trans-3'-hidroxicotinina
ACN/MeOH	*Acetonitrile methanol*
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
CHRNA3	Gene que codifica o receptor colinérgico -nicotínico subunidade α3
CHRNA4	Gene que codifica a subunidade α4 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNA5	Gene que codifica a subunidade α5 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNA6	Gene que codifica a subunidade α6 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNA7	Gene que codifica a subunidade α7 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNB2	Gene que codifica a subunidade β2 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNB3	Gene que codifica a subunidade β3 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNB4	Gene que codifica a subunidade β4 dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRND	Gene que codifica a subunidade δ dos receptores colinérgicos nicotínicos
CHRNG	Gene que codifica o receptor colinérgico -nicotínico subunidade δ
COMT	Gene que codifica a enzima catecol-O-metiltransferase
CYP2B6	Codifica o receptor colinérgico -nicotínico subunidade γ
CYP2B6	Gene que codifica a isoenzima CYP2B6
COT	Cotinina
COT – d3	Cotinina deuterada
CPD	Cigarros por dia
CV	Coeficiente de variação
DN	Dependência à nicotina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse I	Desoxirribonuclease I
dNTP	Dinucleotídeos: dATP, dCTP, dGTP e dTTP
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Efeito matriz
Escore Issa	Escore de consumo situacional Issa
FCTC	*Framework Convention on Tobacco Control*
FDA	*Food and Drug Administration*
FTND	*Fargeström test for nicotine dependence*
HWE	Equilíbrio de *Hardy*-Weinberg

InCor	Instituto do Coração, São Paulo – SP
K_3EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LLOQ	Menor limite de quantificação
MRM	Monitoração de reação múltipla
Na_2EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
nAChR	Receptores colinérgicos nicotínicos
NaCl	Cloreto de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
NMR	*Nicotine metabolite ratio*
OCT2	*Organic cation/ergothioneine transporter 2*
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	*Odds ratio*
PAF	Programa de Assistência ao Fumante
PI	Área padrão interno
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
pH	Potencial hidrogeniônico
RNase	Ribonuclease
RFLP	*Restriction fragment length polymorphism*
RMN	Relação de metabólitos da nicotina
RT^2	*Real Time*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
TAE	Tampão formado com Tris, Acetato e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris-HCl	Tris e ácido clorídrico
TRN	Terapia de reposição nicotínica
T-1	Tempo 1 - Visita inicial
T0	Tempo 0 - Visita de início do tratamento (coleta realizada antes de começar o tratamento no mesmo dia)
T2	Tempo 2 - Visita 2 semanas após tratamento farmacológico
T4	Tempo 4 - Visita 4 semanas após tratamento farmacológico
T12	Tempo 12 - Visita 12 semanas após tratamento farmacológico
UGT2B7	*UDP-Glucuronosyltransferase-2B7*
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	Graus celsius
®	Marca registrada
α3	Subunidade alfa 3 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
α4	Subunidade alfa 4 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
α5	Subunidade alfa 5 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
α6	Subunidade alfa 6 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
α7	Subunidade alfa 7 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
β2	Subunidade beta 2 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
β4	Subunidade beta 4 dos receptores colinérgicos nicotínicos neuronais
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
>	Maio
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Dados gerais e epidemiológicos do tabagismo 18
1.2 Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas da nicotina 19
1.3 Fármacos antitabagismo 20
1.3.1 Vareniclina 20
1.3.2 Bupropiona 21
1.4 Genética e tabagismo 21
1.5 Relação de metabólitos da nicotina (RMN) 22
1.5.1 RMN e associação com desfecho de tratamento 23
1.5.2 RMN e associação com características gerais 24
2 JUSTIFICATIVA 26
3 OBJETIVO 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 28
4.1 Estudo farmacogenético 28
4.1.1 Casuística 28
4.1.2 Obtenção das amostras biológicas 29
4.1.3 Extração e avaliação do DNA genômico 29
4.1.4 Genotipagem 30
4.1.5 Análise estatística 31
4.2 Estudo da RMN 32
4.2.1 Casuística 32
4.2.2 Reagentes 33
4.2.3 Padrões analíticos 33
4.2.4 Equipamentos e acessórios 33
4.2.5 Método toxicológico para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em amostras de soro 34

4.2.6 Extração 34
4.2.7 Parâmetros cromatográficos 34
4.2.8 Parâmetros do espectrômetro de massas 35
4.2.9 Validação do método para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em amostras de soro 35
4.2.9.1 Seletividade 36
4.2.9.2 Menor limite de quantificação, do inglês *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ) 36
4.2.9.3 Linearidade 36
4.2.9.4 Precisão intra e inter-dia 37
4.2.9.5 Exatidão 37
4.2.9.6 Carryover 38
4.2.9.7 Efeito matriz 38
4.2.10 Análise estatística 38
5 RESULTADOS 40
5.1 Estudo farmacogenético 40
5.1.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* (rs8109525) 41
5.1.2 Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg 41
5.1.3 Taxa de sucesso no processo de cessação tabágica dos pacientes tratados com vareniclina de acordo com os genótipos 42
5.2 Estudo da RMN 44
5.2.1 Seletividade 44
5.2.2 Menor limite de quantificação, do inglês *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ) 44
5.2.3 Linearidade 44
5.2.4 Precisão intra e inter-dia 45
5.2.5 Exatidão 45

5.2.6 Carryover 46
5.2.7 Efeito matriz 46
5.2.8 Análises das amostras 46
5.2.9 Características gerais conforme a RMN 47
5.2.10 Concentração de metabólitos de nicotina conforme os desfechos do tratamento antitabágico 48
6 DISCUSSÃO 51
6.1 Estudo farmacogenético 51
6.2 Estudo da RMN 52
7 CONCLUSÕES 55
REFERÊNCIAS 56
ANEXOS 68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dados gerais e epidemiológicos do tabagismo

O tabagismo é um grave problema de saúde pública, contribuindo significativamente para o risco de morte por câncer, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e acidente vascular encefálico. É atualmente considerado uma epidemia, matando mais de 8 milhões de pessoas por ano, em todo mundo. Dessas mortes, aproximadamente 7 milhões são decorrentes do uso direto e 1,2 milhões estão relacionadas ao uso passivo[1].

Aproximadamente 80% dos usuários de tabaco vivem em países de baixa e média renda, onde a carga de doenças e mortes relacionadas ao tabaco é ainda maior. Nesse contexto, o tabagismo contribui para a pobreza pois desvia recursos das famílias destinados às necessidades básicas para o tabaco[2].

Os custos econômicos do tabagismo envolvem não só as doenças causadas pelo uso do tabaco, como também a perda de capital humano resultante da morbimortalidade relacionada ao fumo. Dados do *Centers for Disease Control and Prevention*, (CDC) dos Estados Unidos, estimam um gasto de 225 bilhões de dólares por ano para o tratamento de doenças relacionadas ao cigarro[3].

As agências de saúde pública visam reduzir o consumo de tabaco; no entanto, a recaída ainda é comum durante os programas de tratamento antitabagismo. Estudos estimam que apenas cerca de um terço dos pacientes submetidos ao tratamento farmacológico antitabágico obtêm sucesso[4]. Em 2003, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu o primeiro tratado internacional para o controle do tabaco - *Framework Convention on Tobacco Control* (FCTC) - que está em vigor desde 2005 e atualmente conta com 146 países. Como medidas pactuadas nesse tratado estão o monitoramento do uso do tabaco; instituição de políticas de prevenção; oferta de ajuda e tratamento para cessação tabágica; aplicação de proibições à publicidade, promoção e patrocínio do tabaco; aumento de impostos sobre o tabaco, entre outras[5].

Ainda que a prevalência de fumantes em nível global tenha sido reduzida, dados de 187 países mostraram que o número de fumantes diários aumentou significativamente de 721 milhões, em 1980, para 967 milhões, em 2012[6]. O Brasil segue a mesma tendência mundial, segundo dados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição realizada em 1989, 34,8% da população brasileira acima de 18 anos

era fumante[7]. Os dados mais recentes oriundos da Pesquisa Nacional de Saúde, realizada em 2019, indicam um percentual de 12,6 %[8].

1.2 Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas da nicotina

Derivada da planta do tabaco *Nicotiana tabacum*, a nicotina é um alcaloide que contém alta concentração de nicotina em suas folhas[9]. A nicotina é absorvida através dos alvéolos pulmonares, chegando rapidamente à circulação arterial, sendo distribuída pelos tecidos até atingir o sistema nervoso central (SNC), entre 10 a 19 segundos[10,11]. No plasma e no SNC, os níveis de nicotina declinam rapidamente como resultado da distribuição para os tecidos periféricos[12]. Embora a toxicidade do fumo esteja relacionada a outros componentes do cigarro, a nicotina é a responsável pelo desenvolvimento da dependência[13,14]. O uso continuado da nicotina envolve a melhora do humor, redução da abstinência e melhora do desempenho físico[15].

Sobre os aspectos farmacodinâmicos, diversos neurotransmissores medeiam os efeitos psicoativos da nicotina; contudo, as vias dopaminérgicas são as mais estudadas[16]. Nessas vias, a nicotina estimula os receptores neuronais nicotínicos (nAChR), os quais promovem o aumento da liberação de dopamina mesolímbica[17].

Sobre sua farmacocinética, a nicotina é metabolizada principalmente pelo citocromo p450 (CYP) 2A6, e em menor parte pelas enzimas CYP2B6, CYP2D6 e CYP2E1[18,19]. Vale ressaltar que a nomenclatura *CYP2A6*, designa o gene 6, da subfamília A, família 2. Contendo um grupamento heme, as enzimas do citocromo P450 são mono-oxigenases incorporadas principalmente à bicamada lipídica do retículo endoplasmático dos hepatócitos, participando do metabolismo de diversas drogas, esteroides e carcinógenos[20].

Através do metabolismo mediado pela CYP2A6, a cotinina é o metabólito primário da nicotina, que ainda é metabolizada em 3'-hidroxicotinina (3HC). Este trajeto representa 70-80% do metabolismo da nicotina, onde os metabolitos da cotinina representam a maioria dos metabolitos urinários[18]. A meia-vida da cotinina é de aproximadamente 13 a 19 horas, o que é muito maior do que a meia-vida da nicotina (1-2 horas) ou da 3HC (aproximadamente 5 horas)[18,21]. Pelo fato de a cotinina ter uma meia-vida longa, as suas concentrações no sangue e na urina de fumantes são relativamente estáveis ao longo do dia; no entanto, ainda são um pouco dependentes do tempo desde o último cigarro[18,22]. Dessa forma, as concentrações de

3HC dependem do metabolismo da cotinina que é mediado pela CYP2A6[22], e portanto, a proporção de 3HC para a cotinina é uma medida estável da atividade de CYP2A6 que não depende do momento da última ingestão de nicotina.

1.3 Fármacos antitabagismo

Considerando o quadro de alta prevalência do tabagismo, a forte possibilidade de dependência à nicotina e, principalmente, aos desfechos clínicos desfavoráveis associados ao uso do tabaco, indivíduos fumantes muitas vezes procuram auxílio para parar de fumar. Nesse contexto, estudos demostraram que os tratamentos farmacológicos para cessação do fumo são muito mais eficazes do que os tratamentos não farmacológicos[23–25].

Os tratamentos farmacológicos de primeira linha aprovados no Brasil incluem: a vareniclina (um agonista parcial dos nAChR α4β2), a bupropiona (um inibidor da recaptação da norepinefrina, dopamina e antagonista nicotínico), e a terapia de reposição de nicotina (TRN)[23,26]. A vareniclina é o fármaco mais eficaz para a dependência do tabaco e cessação do tabagismo quando comparada a outros medicamentos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*)[23,27,28].

1.3.1 Vareniclina

A vareniclina é um fármaco desenvolvido especificamente para o tratamento do tabagismo, uma vez que age diretamente nos nAChR. Sua ação está principalmente relacionada ao agonismo parcial dos nAChR compostos pelas subunidades α4β2[29], que são importantes alvos da nicotina relacionados com os efeitos de recompensa, tolerância e sensibilização[29–31]. No entanto, a vareniclina também atua em outros nAChR; tais como o nAChR (α3β4), fracamente nos nAChR (α3β2) e em receptores contendo a subunidade α6. Ainda exerce atividade agonista total nos receptores α7[32].

Evidências demonstram que náuseas e vômitos são os eventos adversos mais comuns no uso da vareniclina e sua ocorrência é relacionada com a dose utilizada, sendo inclusive um dos fatores reportados para justificar o abandono do tratamento[33].

A meia-vida da vareniclina é, em média, 24 horas, independente da dose administrada, sendo excretada em sua maior parte na forma inalterada (cerca de

90%)[34]. O *clearence* estimado da vareniclina é de 88 a 155 mL/min após a administração de uma única dose, e 92 a 143 mL/min após doses repetidas[35,36].

1.3.2 Bupropiona

Inicialmente desenvolvido como um fármaco antidepressivo, observou-se durante a prática clínica o seu potencial em diminuir o desejo de fumar. A bupropiona atua como um inibidor relativamente seletivo da recaptação de norepinefrina e dopamina, com pequeno efeito na recaptação de serotonina. Por último, a bupropiona também atua como um antagonista não competitivo de diversos nAChR[37].

Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual a bupropiona aumenta a capacidade dos pacientes em abster-se do ato de fumar. De acordo com diversas revisões, sugere-se que o mecanismo seja mediado pelas vias noradrenérgicas e/ou dopaminérgicas, minimizando os sintomas da abstinência nicotínica[38]. Os eventos adversos relacionados à bupropiona, quando utilizada para cessação do tabagismo, são em sua maioria: insônia (30-40% dos pacientes) e boca seca (10% dos pacientes)[39].

1.4 Genética e tabagismo

Ensaios com gêmeos e estudos de associação ampla do genoma demostraram que os genes têm um papel importante em diferentes fenótipos relacionados ao tabagismo[40–44]. Estudos recentes demostraram que a persistência do tabagismo e, consequentemente, a dificuldade de cessação do fumo têm uma grande influência de fatores genéticos, com uma herdabilidade de aproximadamente 50%[45,46].

Abordagens em genética, genômica e farmacogenômica se tornam cada vez mais importantes e apresentam um grande potencial para aumentar a compreensão das diferenças individuais na vulnerabilidade, no prognóstico das doenças, e nas respostas aos diferentes tratamentos. Estudos de associação genética podem ajudar a mover o campo da medicina no entendimento dos fatores genéticos envolvidos no processo de dependência à nicotina (DN) e no processo de cessação tabágica promovendo estratégias preventivas e terapêuticas individualizadas[9,47].

A farmacogenética é um campo da farmacologia que identifica o efeito da variação genética sobre o metabolismo, a eficácia e a toxicidade de fármacos sobre

os indivíduos. O objetivo da medicina personalizada com a farmacogenética consiste na combinação da informação genética com outros fatores individuais para adequar as estratégias preventivas e terapêuticas, a fim de melhorar a eficácia e identificar efeitos adversos em menor frequência[47].

Os principais genes relacionados ao tabagismo estão diretamente ligados a dois importantes grupos de vias diferentes. O primeiro se alia na identificação dos alelos que interferem na neurobiologia dos transmissores como dopamina, serotonina e noradrenalina; e o segundo na identificação de genes que podem influenciar a resposta à nicotina, interferindo nos receptores ou no metabolismo da nicotina[48].

Sobre esse último aspecto, sabe-se que indivíduos que metabolizam mais lentamente a nicotina são menos propensos a iniciar o hábito de fumar, pois tendem a experimentar efeitos adversos mais prolongados e mais intensos ao iniciarem o uso do tabaco. Seguinte à fase de iniciação do fumo, quando se tornam fumantes regulares, esse grupo de indivíduos geralmente fuma menos, pois mantém o nível sérico de nicotina alto por mais tempo. De acordo com esses parâmetros de metabolização, o polimorfismo no gene *CYP2A6*, que faz a regulação hepática da enzima transformadora de nicotina em cotinina, tem sido amplamente estudado[48].

Para o gene *CYP2A6*, estudos recentes têm encontrado polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs* – do inglês *Single Nucleotide Polimorphisms*) que se mostraram relevantes frente ao tratamento antitabágico, possibilitando nortear novos estudos na área da farmacogenética. As variantes *CYP2A6**2 (1799 T > A) rs1801272 e *CYP2A6**9 (- 48 T > G) rs28399433, por exemplo, foram apontados como importantes na metabolização de nicotina, podendo influenciar nas recaídas quando em uso de vareniclina e terapia de reposição de nicotina[49]. Para o gene *CYP2B6*, o alelo G de rs8109525 presente na região não codificadora foi associado a uma maior probabilidade de abstinência contínua no período de 9 a 12 semanas com fármacos antitabagismo[50].

1.5 Relação de metabólitos da nicotina (RMN)

Nicotine Metabolite Ratio (NMR) ou Relação de Metabólito da Nicotina (RMN) é um biomarcador validado do metabolismo da nicotina; e é calculado por meio da relação 3HC/CO. Estudos indicam que maiores taxas são associadas a maior metabolização da nicotina (≥ 0,31), maior tempo de abstinência com medicamentos

não nicotínicos, enquanto que, menores taxas indicam uma menor metabolização da nicotina (< 0,31), possibilitando maior tempo de abstinência no tratamento antitabagismo com repositores nicotínicos[18,45,51]. A RMN pode ser medida de forma confiável em saliva, plasma ou soro, tem variação mínima diurna e não depende do tempo em que o ultimo cigarro foi fumado para aqueles indivíduos que fumam mais do que 5 cigarros por dia[18,52].

1.5.1 RMN e associação com desfecho de tratamento

Lerman *et al*[53] observaram a associação entre a taxa de metabolismo da nicotina com a resposta ao tratamento farmacológico para a cessação do tabagismo, em um ensaio com adesivo de nicotina comparado ao *spray* nasal de nicotina, em 480 fumantes. Para os indivíduos que utilizaram adesivo, houve uma redução de quase 30% nas taxas de desistência do tratamento a cada aumento no quartil de RMN. No entanto, não houve associação entre RMN e sucesso no tratamento para os participantes que receberam *spray* nasal de nicotina. Os autores atribuíram esse achado à titulação de autoadministração de *spray* nasal com base na taxa de metabolismo da nicotina; uma vez que os metabolizadores lentos usaram *spray* nasal menos frequentemente do que os metabolizadores normais neste estudo.

Schnoll *et al*[51] analisaram os dados de RMN em um estudo clínico envolvendo 568 fumantes tratados com o adesivo de nicotina. Os autores identificaram taxas de abandono significativamente maiores no final do tratamento para os participantes no primeiro quartil de RMN (os metabolizadores mais lentos) em comparação com todos os outros quartis.

Em um estudo realizado por Ho *et al*[54], com fumantes leves - isto é, aqueles que consumiam menos que 10 cigarros por dia (CPD) - afro-americanos, também foram observados resultados semelhantes. Os participantes foram aleatoriamente designados para receber nicotina ou goma de placebo e aconselhamento. Ao final do tratamento, houve uma tendência para um maior sucesso de abandono entre os metabolizadores mais lentos em comparação com metabolizadores normais ou rápidos. No entanto, essas diferenças foram observadas tanto no grupo placebo quanto no grupo de goma de nicotina, sugerindo que a RMN não previu a eficácia da goma de nicotina comparada ao placebo neste estudo.

Em outro estudo realizado por Lerman *et al*[55], observou-se que o tratamento com adesivo de nicotina (seis meses de tratamento comparado com terapia padrão de oito semanas), melhorou as taxas de abandono entre os metabolizadores lentos, mas não entre metabolizadores normais.

De acordo com os dados apresentados, espera-se que o adesivo de nicotina em uma dose mais elevada seja mais eficaz quando comparado à dose padrão em metabolizadores normais. No entanto, dados de outro ensaio clínico não suportam a hipótese de que uma maior dose de adesivo de nicotina seria mais eficaz em metabolizadores rápidos[56].

Quanto ao tratamento de metabolizadores normais, uma estratégia alternativa seria o uso de medicamentos não nicotínicos. Em um ensaio clínico envolvendo fumantes, os indivíduos foram randomizados e receberam bupropiona ou placebo, durante 10 semanas de tratamento. Ao final do tratamento, aqueles indivíduos que receberam placebo apresentaram taxas de abandono mais baixas no final do tratamento em comparação com metabolizadores mais lentos. Os desfechos dos metabolizadores mais lentos (aqueles no primeiro quartil) foram aproximadamente os mesmos (~ 32%) em ambos os grupos de tratamento. No entanto, os metabolizadores mais rápidos (aqueles no quarto quartil) se beneficiaram significativamente mais do tratamento com bupropiona: as taxas de abandono do tratamento com bupropiona foram de aproximadamente 34%, em comparação com 10% entre metabolizadores rápidos que receberam placebo[57].

As terapias não nicotínicas podem ser tratamentos alternativos eficazes para os metabolizadores normais e rápidos que não respondem bem com repositores de nicotina. De acordo com os resultados apresentados dos estudos, sugere-se que o tratamento antitabágico de metabolizadores normais seja realizado com medicamentos não nicotínicos (vareniclina e/ou bupropiona) e de metabolizadores lentos seja realizado com repositores nicotínicos. Sendo assim, a RMN se torna um biomarcador útil para o tratamento personalizado da cessação do tabagismo.

1.5.2 RMN e associação com características gerais

Lerman *et al*[58] verificaram que metabolizadores lentos se caracterizam por serem indivíduos jovens ($p = 0,02$), brancos ($p < 0,0001$), homens ($p = 0,001$) e que fumam poucos cigarros por dia ($p < 0,001$), quando comparado com metabolizadores

normais. As diferenças de sexo nos grupos de RMN são esperadas devido aos efeitos do estrogênio na taxa de metabolismo da nicotina. Já a diferença étnica, é esperada devido a diferenças na frequência de alelos CYP2A6 reduzidos/inativos.

Chenoweth *et al* [59] observaram que a média de RMN foi maior em brancos quando comparado a afro-americanos [0,41 (0,20) *versus* 0,33 (0,21); p < 0,001] e em mulheres quando comparado aos homens [0,41 (0,22) *versus.* 0,37 (0,20); p < 0,001].

Schnoll *et al* [60] associaram raça e gênero com RMN e demonstraram que as mulheres apresentaram RMN média mais alta do que os homens (p <0,001) e os caucasianos apresentaram RMN média mais alta do que os afro-americanos (p < 0,001). As mulheres eram mais propensas a serem metabolizadores normais da nicotina do que os homens (76% *versus* 67%; p = 0,004) e os caucasianos eram mais propensos a serem metabolizadores normais da nicotina do que os afro-americanos (81% *versus* 54%; p <. 001). A relação entre sexo e dependência de nicotina não foi consistente. O sexo não foi associado à dependência de nicotina medida pelo FTND.

2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a revisão da literatura, a investigação de polimorfismos que se mostram relevantes no processo de tratamento do tabagismo, juntamente com a relação de metabólitos da nicotina podem ser de extrema importância, possibilitando um tratamento individualizado e mais efetivo para a cessação do fumo na população brasileira.

3 OBJETIVOS

Avaliar a possível associação dos polimorfismos rs1801272, rs2839943 *(CYP2A6)* e rs8109525 *(CYP2B6)* com a taxa de sucesso no tratamento antitabágico com vareniclina.

Quantificar a RMN e identificar possíveis associações com o desfecho do tratamento e com características gerais dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo farmacogenético

4.1.1 Casuística

Estudo de coorte retrospectivo para a avaliação farmacogenética (n=167 indivíduos) e aprovado na submissão de processo do Comitê de ética Institucional (SDC: 3579/10/168) do Programa de Assistência ao Fumante (PAF) do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP) que já haviam concluído o tratamento antitabágico com vareniclina, com ou sem sucesso. 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 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.

Como ferramentas para avaliar a dependência à nicotina nos pacientes, o teste de Fagerström para a dependência à nicotina (FTND) tem o intuito de avaliar de forma mais eficaz a dependência física e química em relação ao fumo do tabaco[61–63].

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[64].

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 ≥ 2 pontos, criando assim, a possibilidade de prescrição de fármacos antitabágicos[65].

4.1.2 Obtenção das 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).

4.1.3 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 (1 mM NH_4HCO_3, 144 mM 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.

4.1.4 Genotipagem

Os polimorfismos (Tabela 1) foram genotipados com a tecnologia de PCR em tempo real utilizando a Plataforma TaqMan® (Applied Biosystems, CA, USA) através do equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System.

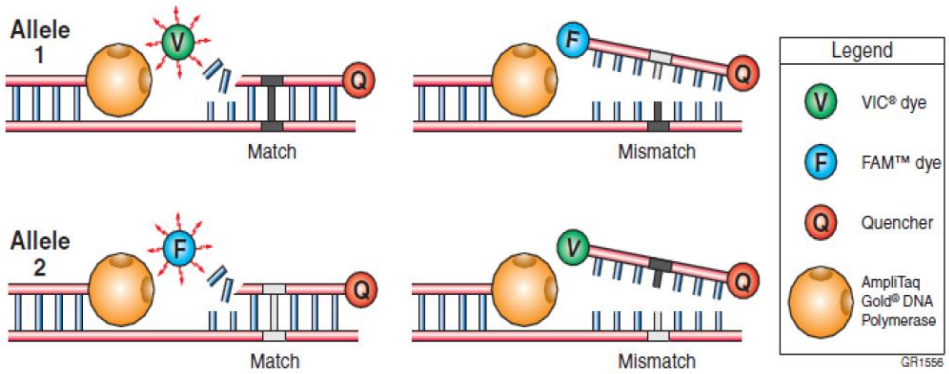
Tabela 1 - Relação dos polimorfismos analisados

Gene	rs	Base nucleotídica	Aminoácido
CYP2A6	rs1801272	T>A	Leu>His
CYP2A6	rs28399433	T>G	TATA box
CYP2B6	rs8109525	A>G	Não codificante

Onde rs: *reference SNP*; T: timina; A: adenina; G: guanina; Leu: leucina; His: histidina.

A plataforma de genotipagem deve estar de acordo com um *layout* padrão oferecido pela empresa. Baseado na técnica de hidrólise das sondas TaqMan®, a genotipagem ocorre por meio de ensaios com duas sondas MGB (Minor Groove Binder) alelo-específica, sendo uma sonda para a sequência normal, marcada com o fluoróforo VIC®, e a outra para a sequência mutante, marcada com o fluoróforo FAM® e primers, permitindo a identificação dos alelos de forma precisa (Figura 1).

Figura 1 - Tecnologia TaqMan®.



Fonte: Manual de procedimento TaqMan®[66]

Durante a PCR, cada sonda hibridiza especificamente com a sua sequência complementar entre os sítios de primers *foward* e *reverse*. A DNA polimerase é capaz de clivar apenas sondas que hibridam ao seu alelo *SNP* específico. A clivagem separa o corante repórter do corante extintor, aumentando substancialmente a fluorescência do corante repórter. Assim, os sinais de fluorescência gerados durante a amplificação por PCR indicam que os alelos estão presentes na amostra. Em seguida é feita a leitura através de captação de fluorescência[66]. Além disso, 1% das amostras foram selecionadas e genotipadas aleatoriamente, como controle de qualidade, gerando resultados idênticos.

4.1.5 Análise estatística

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 de acordo com os polimorfismos nos genes *CYP2A6 e CYP2B6.* 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. As variáveis IMC, Issa e número de doenças diagnosticadas não se apresentaram normais, portanto, foi realizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon-Mann-Whitney.* Modelos de regressão logística múltipla 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, etnia

autodeclarada (branca), gênero (homem) e escore de FTND. O modelo dominante foi escolhido baseado em estudos prévios: *CYP2A6* rs1801272 (TT *versus* TA+AA)[67], *CYP2A6* rs28399433 (AA *versus* AC+CC)[67] e CYP*2B6* rs8109525 (AA *versus* AG+GG). As análises estatísticas foram realizadas no *software* IBM SPSS *Statistics* 20, com o nível de significância de P ≤ 0,05.

4.2 Estudo da RMN

4.2.1 Casuística

Estudo de coorte prospectivo com 185 pacientes, de ambos os sexos, provenientes do PAF, através do protocolo de pesquisa: “Avaliação da eficácia do uso dos marcadores genéticos na escolha do tratamento farmacológico do tabagismo”, aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (SDC: 4341/16/007).

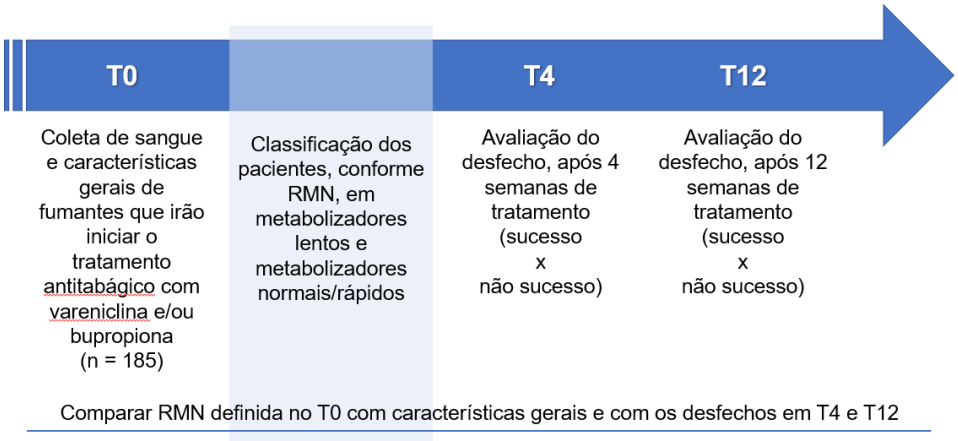
A relação de trans-3'-hidroxicotinina/cotinina (3HC/CO) foi obtida a partir da dosagem em soro sanguíneo de ambos os metabólitos pela técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

As amostras foram coletadas no Tempo 0 (T0) das visitas, enquanto o paciente ainda estava fumando. Através da amostra de soro coletada no T0, foi possível observar a relação de metabólitos da nicotina através da relação 3HC/CO, e classificar os pacientes de acordo com os seguintes parâmetros[18]: RMN < 0,31ng/mL metabolizadores lentos; RMN ≥ 0,31 ng/mL metabolizadores normais e rápidos.

Posteriormente, conforme o desenho do estudo (Figura 2), verificou-se a associação da RMN com o desfecho de tratamento (sucesso e não sucesso), 4 (T4) e 12 (T12) semanas após o início do tratamento. Os pacientes que pararam de fumar nos momentos avaliados foram considerados bem sucedidos. Os pacientes que iniciaram o tratamento com vareniclina em monoterapia e que foram considerados resistentes no T4, tiveram bupropiona adicionada ao tratamento como fármaco adjuvante.

Além disso, também verificou-se a associação da RMN com características gerais, tais como idade, gênero, raça/cor autodeclarada e FTND.

Figura 2 - Desenho do estudo



Fonte: Autoria própria

4.2.2 Reagentes

Todos os solventes foram adquiridos pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

4.2.3 Padrões analíticos

Padrões analíticos de cotinina (COT) e hidroxicotinina (3HC) na concentração de 1,0 mg/mL e o padrão deuterado cotinina-d3 (COT-d3) na concentração de 100 µg/mL em metanol (todos com pureza > 99%) foram adquiridos da Ceriliant Corporation (Round Rock, EUA).

4.2.4 Equipamentos e acessórios

As análises foram efetuadas no sistema de cromatografia líquida Acquity UPLC da Waters (Milford, EUA) acoplado a um espectrómetro de massas Quattro Premier XE da Micromass (Wilmslow, Reino Unido). A separação cromatográfica foi obtida através de uma coluna Acquicty UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), adquirida também na Waters (Milford, EUA).

A extração da amostra consistiu em uma precipitação de proteína simples e direta usando uma mistura fria de ACN/MeOH (80:20/v:v). Para isso, foi utilizado o equipamento vórtex multi-90 tubos, modelo VX-2500, da VWR (Thorofare, EUA), além de uma centrífuga, modelo 5702, da Eppendorf (Berzdorf, Alemanha).

O programa Microsoft Excel® 2011 foi utilizado para o tratamento dos dados obtidos através da exportação dos dados brutos.

4.2.5 Método toxicológico para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em amostras de soro

O método toxicológico desenvolvido teve como objetivo a quantificação de cotinina e hidroxicotinina nas amostras de soro de pacientes coletadas no T0. Para tal foi utilizada a técnica de cromatografia liquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4.2.6 Extração

O método desenvolvido consistiu em retirar uma alíquota de 100 µL de soro para um tubo *Eppendorf* juntamente com 20 µL do padrão interno deuterado (COT-d3) a uma concentração de 500 ng/mL. Em seguida, diluiu-se com 880 µL de uma mistura fria de ACN/MeOH (80:20/v:v) e agitou-se durante 30 segundos utilizando o vórtex. Depois disso, a solução foi centrifugada a 9000 g durante 6 min e uma alíquota de 3 µL foi injetada diretamente no sistema LC[68].

4.2.7 Parâmetros cromatográficos

A separação cromatográfica foi alcançada em uma coluna de Acquicty UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) eluída com um gradiente de água (eluente A) e acetonitrila (eluente B) ambos suplementados com 0,1% de ácido fórmico com um fluxo de 0,4 mL/min, 40 °C e um tempo de execução cromatográfico de 5 min. O gradiente pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Gradiente cromatográfico utilizado incluindo o fluxo utilizado e a respectiva porcentagem de fases móveis A e B utilizadas ao longo da corrida cromatográfica.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0.4	98	2
2.0	0.4	30	70
2.5	0.4	30	70
2.6	0.4	98	2
5.0	0.4	98	2

Onde %A: % do eluente A; %B: % do eluente B

4.2.8 Parâmetros do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massa foi operado sob o modo de monitoração de reação múltipla (MRM) usando a técnica de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI^+; $[M + H]^+$), como segue: gás de dessolvatação, 1100 L/h; gás do cone, 200 L/h; temperatura de dessolvatação, 450 °C; temperatura da fonte, 120 °C; tensão capilar, 1000 V. Todas as transições MRM para todos os analitos e o respectivo padrão interno estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Transições MRM e condições experimentais para a detecção de todos os analitos e padrão interno

Analito	TR	Precursor ion (m/z)	QT (m/z)	EC	QL 1 (m/z)	EC	QL 2 (m/z)	EC
Cotinina	0,98	177,4	79,81	24	97,84	20	145,88	18
Hidroxicotinina	0,70	193,03	57,98	32	79,80	28	133,84	18
Cotinina-d_3	0,98	180,02	79,92	30	79,86	24	100,77	22

Onde TR: tempo de retenção; QT: quantificador; QL: qualificador; EC: energia de colisão.

4.2.9 Validação do método para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em amostras de soro

O método para a confirmação de cotinina e hidroxicotinina em amostras de soro foi validado de acordo com os parâmetros internacionais recomendados. Para isso, seguiram-se as seguintes diretrizes: *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013): "Práticas padrão para validação de métodos em Toxicologia

Forense”[69] e *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2009): "Orientação para a validação de metodologia analítica e calibração de equipamentos utilizados para testes de drogas ilícitas em materiais apreendidos e amostras biológicas”[70].

Neste contexto, os seguintes parâmetros foram testados: seletividade; menor limite de quantificação (LLOQ); linearidade; precisão intra e inter-dia; exatidão; *carryover* e efeito matriz.

4.2.9.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da análise de seis amostras zero (apenas com padrão interno) e duas amostras em branco (sem qualquer substância adicionada). A presença ou ausência de picos interferentes (substâncias endógenas) perto do tempo de retenção do analito foi avaliada.

4.2.9.2 Menor limite de quantificação, do inglês *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ)

Quanto à determinação de LLOQ, três amostras de uma concentração conhecida foram analisadas em três corridas para provar que todos os critérios necessários para a detecção; identificação; precisão e exatidão foram alcançadas (coeficiente de variação (%CV) < 15%). Foi também observado se os ensaios de LLOQ obtiveram tempos de retenção com uma variação máxima de ± 2% e espectros de massa com a mesma aparência e proporção de íons. Este foi também estabelecido como o primeiro ponto da curva.

4.2.9.3 Linearidade

A linearidade foi obtida através da análise de amostras extraídas, que foram estimadas nas concentrações desejadas em seis replicatas. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram de 0,99.

O estudo da linearidade foi estimado pela análise de amostras extraídas obtidas a partir de alíquotas de soro com concentração do padrão interno de 500 ng/mL. Os analitos de interesse não-deuterados foram adicionados nas seguintes concentrações: COT e 3HC: 10; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng/mL.

4.2.9.4 Precisão intra e inter-dia

A precisão intra-dia foi determinada pela análise de quatro controles de qualidade em seis replicatas em um único dia, enquanto que a precisão inter-dia foi determinada pela análise de quatro níveis de controle em seis replicatas por três dias consecutivos.

Os resultados obtidos a partir deste ensaio são expressos em %CV e foram calculados através da função ANOVA de fator único no Microsoft Excel®. Os quatro níveis de controles estudados foram: baixo (CB); médios 1 (CM1) e 2 (CM2) e alto (CA) como indicado na Tabela 4, tendo em consideração que as concentrações do CB devem ser aproximadamente três vezes o ponto mais baixo da curva de calibração e as concentrações do CA devem estar dentro de aproximadamente 80% (ou mais) do ponto mais alto da curva de calibração, enquanto que as concentrações de CM1 e CM2 devem estar próximas dos pontos médios da curva de calibração.

Tabela 4 - Valores dos controles baixo, médios e alto utilizados no método para a determinação de cotinina e hidroxicotinina em soro.

Analitos	CB (ng/mL)	CM1 (ng/mL)	CM2 (ng/mL)	CA (ng/mL)
COT	25	300	600	900
3HC	25	300	600	900

Onde CB: controle baixo; CM: controle médio 1; CM2: controle médio 2; CA controle alto.

4.2.9.5 Exatidão

O teste de exatidão foi realizado através da quantificação de seis replicatas para cada nível de controle usando uma curva de calibração anterior. Os resultados obtidos a partir desse ensaio foram expressos como uma percentagem do valor da concentração conhecida:

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média medida} - \text{concentração nominal}}{\text{concentração nominal}} \times 100$$

O critério de aceitação utilizado foi de 20% para o CB e 15% para CM1; CM2 e CA.

4.2.9.6 Carryover

Este parâmetro foi testado através da análise de três amostras brancas injetadas no sistema LC-MS/MS imediatamente após a amostra mais concentrada da curva de calibração.

4.2.9.7 Efeito matriz

O efeito matriz (EM) foi calculado através da análise de seis amostras de soro de diferentes indivíduos adicionadas de padrão (concentração do CB) e a resposta foi comparada à resposta da análise realizada na mesma concentração em amostras brancas (sem soro).

Após o cálculo das seis respostas o valor final é expresso em %CV, como se pode observar na seguinte fórmula:

$$EM\ (\%) = \frac{(área\ matriz\ \div\ área\ padrão\ interno)n}{média\ (área\ branco\ \div\ área\ padrão\ interno)} \times\ 100$$

Onde área matriz representa a área absoluta de cada amostra de soro; área branca, a área absoluta das análises sem matriz; área PI, a área absoluta do padrão interno e n, o número de análises (seis soros e seis replicatas da amostra branco)[65].

4.2.10 Análise estatística

Em relação às características gerais, as variáveis contínuas (idade em anos e número de cigarros por dia) foram apresentadas como média e desvio padrão, e as variáveis categóricas (sexo e raça/cor autodeclarada) como frequências.

O teste do qui-quadrado foi realizado para análise comparativa das variáveis categóricas gerais com o perfil do metabolismo e frequência de metabolizadores lentos de acordo com o tratamento farmacológico e seus desfechos. Os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram realizados para verificar a normalidade das variáveis contínuas. As características gerais estavam de acordo com o perfil de metabolização, e os valores de RMN e concentração de metabólitos estavam de acordo com o tratamento farmacológico e seus desfechos. O teste de hipótese de

Mann-Whitney foi utilizado para valores de RMN e concentração de metabólitos, pois essas variáveis não têm distribuição normal e, portanto, foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil entre 25% e 75%. O teste de correlação de *Spearman* foi realizado para avaliar a associação das concentrações de metabólitos com o número de cigarros por dia.

Toda as análises foram realizadas no software SPSS (versão 20, IBM Corp, Armonk, Nova York, EUA), considerando um nível de significância de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo farmacogenético

A Tabela 5 mostra as características gerais e clínicas do grupo total dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo.

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas dos pacientes submetidos ao tratamento antitabagismo (n = 167)

Características gerais	n
Idade (anos)	52±0,8
Gênero, mulheres (%)	57,2
Raça/cor autodeclarada, brancos (%)	83,6
Índice de massa corporal (kg/m^2)	27±0,35
Escolaridade, nível superior (%)	46,3
FTND	7,0±0,2
FTND, ≥6 (%)	78
Escore Issa	3,0±0,2
Escore Issa, ≥3 (%)	81,8
Hipertensão (%)	47,2
Doença arterial coronariana (%)	9,6
Infarto agudo do miocárdio (%)	10,8
Dislipidemia (%)	56,2
Diabetes melito tipo 2 (%)	11,7
Depressão (%)	18,7
Ansiedade (%)	12
Doença pulmonar obstrutiva crônica (%)	10,8
Asma (%)	1,8
Número de doenças diagnosticadas	1,8±0,1

Onde FTND: teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=159); Escore Issa: escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=33).

Devido a não amplificação de algumas amostras durante a genotipagem, o tamanho amostral (n = 167) foi reduzido em relação aos polimorfismos *CYP2A6* rs1801272, *CYP2A6* rs28399433, *CYP2B6* e rs8109525 (n = 159; n = 147; n = 162), respectivamente.

5.1.1 Resposta ao tratamento antitabagismo, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* (rs8109525)

A Tabela 6 mostra as características gerais e clínicas, de acordo com o polimorfismo *CYP2B6* rs8109525, do grupo de pacientes tratados com vareniclina. Não foram encontradas diferenças significativas nos dados demográficos e clínicos dos pacientes tratados com vareniclina.

Tabela 6 - Características clínicas e demográficas do grupo total de pacientes, de acordo com o polimorfismo CYP2B6 (rs8109525)

Características gerais	AA (n = 74)	AG e GG (n = 88)	P-valor
Idade (anos)	52±1,2	52±1,1	0,82
Gênero, mulheres (%)	62,2	53,4	0,26
Etnia autodeclarada, brancos (%)	79,7	89,7	0,08
Escolaridade, nível superior (%)	45,6	48,6	0,73
Índice de massa corporal (kg/m^2)	27±0,6	27±0,5	0,74
FTND	6,7±0,3	7,0±0,3	0,24
FTND, ≥ 6 (%)	77,5	77,4	0,99
Escore Issa	3,5±0,2	2,8±0,2	0,09
Escore Issa, ≥ 3 (%)	100	71,4	0,07
Hipertensão (%)	45,2	48,8	0,65
Doença arterial coronariana (%)	2,7	14,8	0,01
Infarto agudo do miocárdio (%)	4,1	15,9	0,02
Dislipidemia (%)	58,3	54,7	0,64
Diabetes melito tipo 2 (%)	12,3	9,4	0,55
Depressão (%)	20,3	17	0,60
Ansiedade (%)	13,5	11,4	0,68
DPOC (%)	12,2	10,2	0,70
Asma (%)	1,4	2,3	1,0
Número de doenças diagnosticadas	1,5±0,2	2,0±0,2	0,10

Onde FTND: Teste de Fagerström para dependência à nicotina – *Fagerström test for nicotine dependence* (escala de 0 a 10 pontos) (n=159); Escore Issa: escore de consumo situacional Issa (escala de 0 a 4 pontos) (n=33); DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

5.1.2 Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg

A Tabela 7 mostra a frequência alélica e a distribuição genotípica de cada polimorfismo, os quais estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE).

Tabela 7 - Frequências genotípicas e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismos	Distribuição genotípica (%)	Alelo de menor frequência (%)	HWE	P-valor
CYP2A6 rs1801272	TT = 96,2 (n = 153) TA = 3,8 (n = 6) AA = 0 (n = 0)	Alelo A = 1,9	$X^2 = 0,06$	0,81
CYP2A6 rs28399433	AA = 89,1 (n = 131) AC = 8,9 (n = 13) CC = (n = 3)	Alelo C = 6,5	$X^2 = 10,6$	0,001
CYP2B6 rs8109525	AA= 45,7 (n=74) AG= 46,3 (n=75) GG= 8,0 (n=13)	Alelo G= 31,2	$X^2 = 1,0$	0,32

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

5.1.3 Taxa de sucesso no processo de cessação tabágica dos pacientes tratados com vareniclina de acordo com os genótipos

A Tabela 8 mostra a taxa de sucesso na cessação tabágica dos pacientes de acordo com os genótipos para os polimorfismos *CYP2A6* rs1801272, *CYP2A6* rs28399433 e *CYP2B6* rs8109525. Os genótipos AG ou GG para o polimorfismo *CYP2B6* rs8109525 foram associados a maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo com vareniclina quando comparado com o genótipo AA.

Tabela 8 - Taxa de sucesso de acordo com os genótipos

Polimorfismos	Taxa de sucesso (%)		P-valor
CYP2A6 rs1801272	TT 43,0	TA ou AA 50,0	0,52
CYP2A6 rs28399433	AA 41,4	AC ou CC 43,8	0,86
CYP2B6 rs8109525	AA 33,3	AG ou GG 51,2	0,03

Onde rs: *reference SNP*.

A Tabela 9 mostra uma análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica dos pacientes tratados com vareniclina. Os genótipos TA ou AA e AC ou CC para os rs1801272 e rs28399433, não apresentaram OR para o sucesso (OR = 1,27; IC 95%= 0,24 - 6,73; P = 0,78); (OR = 0,92; IC 95% = 0,30 - 2,83; P = 0,88) em um modelo múltiplo por gênero, idade, etnia e escore de FTND, respectivamente.

Tabela 9 - Análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n = 167) para o CYP2A6 rs1801272 e rs28399433

Variáveis	OR	IC 95%	P-valor
Genótipos TA ou AA para o *CYP2A6* rs1801272	1,27	0,24-6,73	0,78
Gênero (homem)	1,38	0,70-2,72	0,36
Idade	1,00	0,96-1,03	0,87
Etnia autodeclarada (branca)	1,29	0,46-3,60	0,63
Escore de FTND	0,95	0,84-1,07	0,38
Genótipos AC ou CC para o *CYP2A6* rs28399433	0,92	0,30-2,83	0,88
Gênero (homem)	1,84	0,90-3,77	0,10
Idade	0,99	0,96-1,03	0,58
Etnia autodeclarada (branca)	1,45	0,51-4,10	0,49
Escore de FTND	0,93	0,82-1,06	0,27

Onde rs: *reference SNP*; FTND: teste de Fagerström para dependência à nicotina – Fagerström test for nicotine dependence; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança.

Tabela 10 - Análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica nos pacientes submetidos ao tratamento com vareniclina (n = 167) para o CYP2B6 rs8109525

Variáveis	OR	IC 95%	P-valor
Genótipos AG ou GG para o *CYP2B6* rs8109525	2,01	1,01-4,00	0,047
Gênero (homem)	1,50	0,76-2,97	0,24
Idade	0,99	0,97-1,03	0,95
Etnia autodeclarada (branca)	1,21	0,43-3,46	0,72
Escore de FTND	0,94	0,83-1,06	0,31

Onde rs: *reference SNP*; FTND: teste de Fagerström para dependência à nicotina – Fagerström test for nicotine dependence; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança.

A Tabela 10 mostra uma análise de regressão logística múltipla para o sucesso na cessação tabágica dos pacientes tratados com vareniclina. Os genótipos AG ou GG, para o rs8109525, foram associados com maior OR para o sucesso (OR = 2,01;

IC 95% = 1,01 - 4,00; P = 0,047) em um modelo múltiplo por gênero, idade, etnia e escore de FTND.

5.2 Estudo da RMN

5.2.1 Seletividade

O método não apresentou picos de interferência nos tempos de retenção de interesse. O método foi seletivo para todos os analitos.

5.2.2 Menor limite de quantificação, do inglês *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ)

Para ambas as substâncias foram atingidos valores de LLOQ de 10 ng/mL.

5.2.3 Linearidade

O intervalo linear estudado começou no valor de LLOQ (10 ng/mL) e foi até 1000 ng/mL para ambos os analitos estudados.

Tabela 11 - Resultado do ensaio de linearidade para os analitos de COT e 3HC

Analitos	Faixa de concentração	Equação da curva de calibração	Fator de peso aplicado	r^2
COT	10 - 1000 ng/mL	$y = 0{,}0027x - 0.0004$	$1/y^2$	0.997
3HC	10 - 1000 ng/mL	$y = 0{,}0028x + 0.0162$	$1/x^2$	0.999

Onde 3HC: 3-hidroxicotinina; COT: cotinina. Os valores apresentados indicam: a faixa de concentração; equações da curva de calibração; fatores de pesagem aplicados e r^2 após correção adequada utilizando a ferramenta estatística *F-test*.

O método mostrou ser linear tanto para cotinina como para hidroxicotinina com valores de r^2 iguais ou superiores a 0,99. O fenômeno de heteroscedasticidade foi observado através do teste *F* e a tabela a seguir apresenta os dados para os intervalos de concentração, equações da curva de calibração, fatores de peso utilizados e coeficientes de determinação após a colocação de pesos de correção adequados

(Tabela 11). As letras *x* e *y* representam a concentração e a área relativa do analito, respectivamente.

5.2.4 Precisão intra e inter-dia

Os valores da precisão intra-dia variaram de 5.26 a 18.27%, enquanto a precisão inter-dia mostrou uma variação entre 4.26 e 19.22% para os quatro níveis avaliado. Como pode ser observado na Tabela 12, os valores mais altos referem-se ao controle baixo (CB) da hidroxicotinina e isso é provavelmente devido ao fato de que essa substância foi analisada juntamente com o padrão interno deuterado da cotinina (COT-d3) e não dela própria, por não estar disponível.

Tabela 12 - Resultados do ensaio de precisão intra e inter-dia para todos os níveis de controle de qualidade dos analitos de interesse, expressos como porcentagem do desvio padrão relativo (%CV)

Níveis de controle		COT (% CV)	3HC (% CV)
Intra-dia	CB	18.27	13.05
	CM1	7.05	8.36
	CM2	8.88	7.69
	CA	5.26	5.92
Inter-dia	CB	15.58	19.22
	CM1	4.26	11.63
	CM2	5.48	6.90
	CA	11.14	9.35

Onde 3HC: 3-hidroxicotinina; COT: cotinina; CB: controle baixo; CM: controle médio 1; CM2: controle médio 2; CA controle alto; %CV: % do desvio padrão relativo.

5.2.5 Exatidão

Este parâmetro provou estar dentro dos critérios internacionais aceitos para a validação do método e os valores estão presentes na Tabela 13.

De maneira geral, o menor valor obtido foi de 82.03% (CB da COT) e o mais alto 114.49% (CM1 da 3HC), o que demonstra que o intervalo está dentro de valores aceitáveis já que os guias de validação estipulam uma faixa entre 80 e 120% para os controles baixos e entre 85 e 115% para os demais.

Tabela 13 - Resultados da exatidão do método desenvolvido para a determinação de COT e 3HC em amostras de soro para todos os níveis de controle de qualidade do analito e seus respectivos valores expressos em porcentagem (%)

Níveis de controle	COT (%)	3HC (%)
CB	82,03	106,98
CM1	86,83	114,49
CM2	86,22	100,96
CA	85,34	95,99

Onde 3HC: 3-hidroxicotinina; COT: cotinina; CB: controle baixo; CM: controle médio 1; CM2: controle médio 2; CA controle alto.

5.2.6 Carryover

Não foram observadas quaisquer interferências de *carryover* através da ausência de picos nos tempos de retenção do analito nas três amostras em branco consecutivas, injetadas diretamente após o ponto de calibração mais alto da curva de calibração.

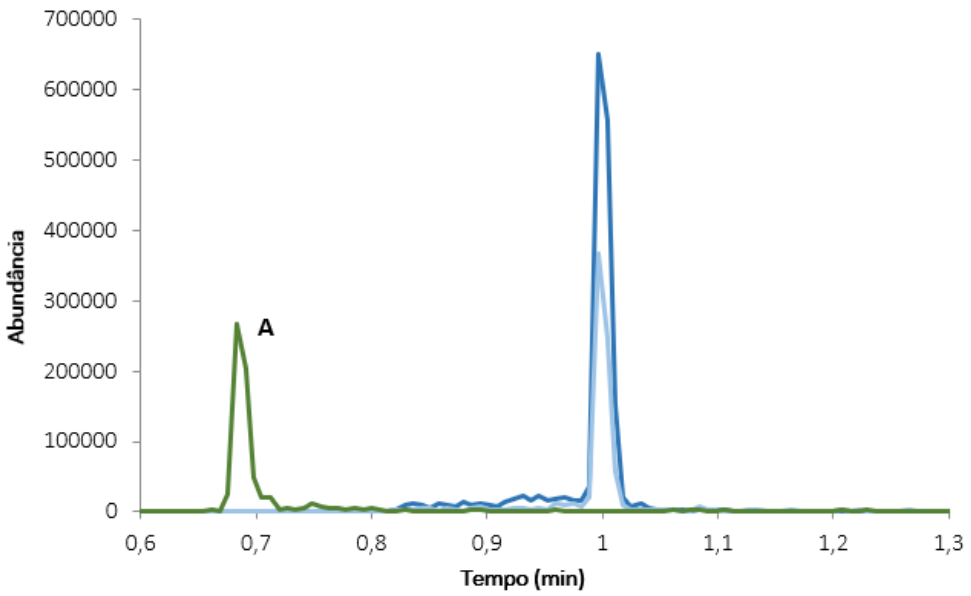
5.2.7 Efeito matriz

O método não apresentou efeito matriz significativo uma vez que os coeficientes de variação (%CV) entre os ensaios foram menores do que 15%.

5.2.8 Análises das amostras

Inicialmente, o método foi validado inteiramente com amostras brancas de voluntários que não fizessem uso das substâncias de interesse. Posteriormente, após a validação do método, foram quantificadas um total de 185 amostras de pacientes fumantes. O cromatograma ilustra o resultado de uma das amostras analisadas, como exemplo.

Figura 3 - Cromatograma de LC-MS/MS obtido depois da análise da amostra número 14 através do método previamente descrito



Os valores obtidos para nesta amostra foram de 3HC: 151.06 ng/mL (A); COT: 194.53 ng/mL (B) junto com o padrão interno de COT-d3 a 500 ng/mL (C).

Fonte: Autoria própria

5.2.9 Características gerais conforme a RMN

Dos 185 pacientes avaliados, 130 (70,3%) foram classificados como metabolizadores normais ou rápidos e 55 (29,7%) como metabolizadores lentos pela RMN. A média de idade foi de 51±11 anos, sendo 113 (61,1%) do sexo feminino e 145 (78,4%) autodeclarados brancos.

Tabela 14 - Características gerais conforme a RMN.

Características gerais	Metabolizadores normais e rápidos* (n = 130)	Metabolizadores lentos** (n = 55)	P-valor
Idade (anos)	52 ± 11	50 ± 12	0.32
Gênero, mulher (%)	58.5	67.3	0.26
Etnia#, branca (%)	80.0	74.5	0.41
Número de cigarros por dia	20 ± 9	20 ± 8	0.97

Onde RMN: Relação de Metabólitos da Nicotina. *Metabolizadores normais e rápidos: RMN ≥ 0.31. **Metabolizadores lentos: RMN < 0.31. #Etnia autodeclarada.

A média de cigarros por dia foi de 20±9. 113. A Tabela 14 mostra a comparação de idade, sexo, raça/cor autodeclarada e número de cigarros por dia segundo categorias de RMN. Não houve diferenças significativas entre as características gerais e metabolizadores normais/rápidos e lentos.

5.2.10 Concentração de metabólitos de nicotina conforme os desfechos do tratamento antitabágico

A concentração dos metabólitos da nicotina - CO e 3HC - medida no T0, foi apresentada como mediana (percentis 25% e 75%). Tais concentrações estão disponíveis na Tabela 15 de acordo com os resultados do tratamento para cessação do tabagismo, avaliados 4 e 12 semanas após o início do tratamento farmacológico.

Os valores de RMN também foram apresentados como mediana (percentis de 25% e 75%). Para este cálculo, a hidroxicotinina foi considerada como trans-3-hidroxicotinina, uma vez que a quantidade de outros isômeros era irrelevante.

Tabela 15 - Concentração de metabólitos da nicotina conforme o desfecho do tratamento antitabágico

	Resistente T4** (n = 105)	Sucesso T4** (n = 59)	P-valor	Resistente T12** (n = 61)	Sucesso T12** (n = 101)	P-valor
COT (µg/L)***	74.60 (47.75 - 118.53)	59.20 (43.00 - 92.10)	0.08	75.00 (53.85 - 120.79)	65.40 (42.45 - 107.85)	0.11
3HT (µg/L)***	60.80 (5.80 - 101.77)	37.40 (9.60 - 66.50)	0.07	56.25 (9.75 - 103.55)	44.60 (6.95 - 87.00)	0.42
RMN	0.69 (0.09 - 1.15)	0.60 (0.14 - 0.93)	0.33	0.65 (0.23 - 0.96)	0.64 (0.10 - 1.09)	0.80
Metabolizadores lentos (%)*	28.6	30.5	0.79	27.9	30.7	0.70

Onde 3HT: 3-hidroxicotinina; COT: cotinina; RMN: Relação de Metabólitos da Nicotina; T4: visita 4 semanas após o tratamento farmacológico; T12: visita 12 semanas após o tratamento farmacológico. *Metabolizadores lentos: RMN < 0,31). **Resultados T4 (n = 164), resultados T12 (n = 162). ***Concentrações de metabólitos de amostras de soro coletadas antes do início do tratamento, enquanto os pacientes ainda estavam fumando (T0).

Dos 164 pacientes avaliados em T4, apenas 59 (36%) obtiveram sucesso terapêutico com o tratamento farmacológico antitabagismo. Dos 105 (64%) pacientes que não obtiveram sucesso e, portanto, foram considerados resistentes, 30 (28,6%)

eram metabolizadores lentos, de acordo com a classificação de RMN realizada em T0. Dos 162 pacientes avaliados em T12, 101 (62,4%) obtiveram sucesso terapêutico com tratamento farmacológico antitabagismo. Dos 61 (37,6%) pacientes considerados resistentes, 17 (27,9%) eram metabolizadores lentos, de acordo com a classificação de RMN realizada em T0. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos avaliados.

A Tabela 16 mostra as concentrações medianas de metabólitos de nicotina (25% e 75% percentis) que foram coletadas em T0 de acordo com o resultado do tratamento com as drogas vareniclina, bupropiona e vareniclina mais bupropiona. Nenhum dos metabólitos apresentou diferença significativa entre os medicamentos e desfechos associados.

Tabela 16 - Concentração dos analitos conforme o desfecho de tratamento e fármacos antitabágicos

			Vareniclina			
	Resistente T4 (n = 70)	Sucesso T4 (n = 46)	P-valor	Resistente T12 (n = 8)	Sucesso T12 (n = 56)	P- valor
COT (µg/L)	71.10 (47.50 - 104.05)	62.30 (41.23 - 86.93)	0.17	75.35 (58.48 - 158.49)	65.10 (41.80 - 102.98)	0.22
3HT (µg/L)	59.70 (11.55 - 98.35)	37.65 (10.50 - 69.32)	0.23	55.50 (27.85 - 81.43)	44.77 (11.15 - 78.32)	0.56
RMN	0.67 (0.20 - 1.20)	0.61 (0.29 - 0.92)	0.51	0.63 (0.36 - 0.87)	0.61 (0.29 - 0.93)	0.97
Metabolizadores lentos (%)*	28.6	28.3	0.97	12.5	26.8	0.67
			Bupropiona			
	Resistente T4 (n = 31)	Sucesso T4 (n = 9)	P- valor	Resistente T12 (n = 1)	Sucesso T12 (n = 7)	P- valor
COT (µg/L)	105.48 (58.00 - 139.64)	56.10 (41.30 - 135.60)	0.26	39.60	56.10 (43.00 - 145.34)	0.50
3HT (µg/L)	67.23 (2.00 - 119.30)	40.60 (11.15 - 82.40)	0.42	40.10	42.90 (21.10 - 98.66)	0.75
RMN	0.75 (0.04 - 1.14)	0.78 (0.17 - 1.17)	0.78	1.01	0.78 (0.31 - 1.32)	0.75
Metabolizadores lentos (%)*	25.8	22.2	1.00	0.0	14.3	1.00
			Vareniclina e Bupropiona			
	Resistente T4 (n = 3)	Sucesso T4 (n = 4)	P- valor	Resistente T12 (n = 27)	Sucesso T12 (n = 38)	P- valor
COT (µg/L)	45.90 (41.90 - 58.68)	64.65 (51.95 - 224.66)	0.40	84.40 (60.92 - 120.30)	70.30 (41.55 - 108.98)	0.17
3HT (µg/L)	71.44 (1.60 - 103.67)	12.80 (0.95 - 34.17)	0.23	59.10 (1.10 - 114.50)	48.50 (1.10 - 100.10)	0.66
RMN	1.00 (0.04 - 1.98)	0.08 (0.01- 0.41)	0.23	0.65 (0.02 - 0.93)	0.67 (0.02 - 1.29)	0.56
Metabolizadores lentos (%)*	33.3	75.0	0.49	33.3	39.5	0.61

Onde 3HT: 3-hidroxicotinina; COT: cotinina; RMN: Relação de Metabólitos da Nicotina; T4: visita 4 semanas após o tratamento farmacológico; T12: visita 12 semanas após o tratamento farmacológico. *Metabolizadores lentos: RMN < 0,31). Para Vareniclina, resultados T4 (n = 116), resultados T12 (n = 64). Para bupropiona, resultados T4 (n = 40), resultados T12 (n = 8). Para vareniclina e bupropiona, resultados T4 (n = 7), resultados T12 (n = 65)

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo farmacogenético

De acordo com os resultados do presente estudo, o grupo de pacientes com genótipos AG e GG para o polimorfismo *CYP2B6* rs8109525 apresentou maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo com vareniclina quando comparado com o grupo de genótipo AA. Nossos resultados corroboram com o estudo de King *et al* [47], os quais encontraram a associação do alelo G para o polimorfismo rs8109525 com uma maior probabilidade de abstinência contínua no período de 9 a 12 semanas em pacientes tratados com fármacos antitabagismo.

O rs8109525 é um polimorfismo localizado na região intrônica do gene *CYP2B6*, o qual é responsável pela codificação da isoenzima de mesmo nome. A isoenzima CYP2B6 desempenha um papel importante no metabolismo da nicotina, embora não seja a principal isoenzima metabolizadora[18,44]. Além disto, a presença da variante rs8109525 foi relacionada à menor expressão de mRNA de CYP2B6 em amostras de fígado humano[44].

De maneira semelhante, há indícios de que a CYP2B6 também desempenha função no metabolismo cerebral da nicotina. Em ratos, a inibição seletiva do CYP2B cerebral, que mimetiza o metabolismo da CYP2B6 geneticamente lento em humanos, foi associada a altos níveis de nicotina no cérebro (mas não no plasma) e um maior número de sessões necessárias para extinguir o comportamento de autoadministração da nicotina [50].

O polimorfismo também apresenta forte desequilíbrio de ligação com polimorfismos do tipo *missense*, os quais definem haplótipos paras as variantes *CYP2B6* * 5 e * 6 (rs3211371, rs3745274 e rs2279343), preditoras de metabolização lenta. A presença desses polimorfismos poderia ser responsável pela associação encontrada[44].

Estudos recentes mostraram que metabolizadores nicotínicos normais apresentam maior reatividade do circuito de recompensa dopaminérgico do que metabolizadores lentos[71]. No mesmo sentido, Sofuoglu *et al*[72] mostraram que metabolizadores normais apresentam maiores oscilações da concentração de nicotina no sangue (e provavelmente no cérebro). Assim, a variação da concentração de nicotina poderia explicar a maior exacerbação do circuito de recompensa e implicar

em sintomas de abstinência mais intensos. Consequentemente, menores flutuações cerebrais da concentração de nicotina em metabolizadores lentos, poderiam facilitar a cessação tabágica em resposta ao tratamento antitabagismo[58,72].

A nossa hipótese para explicar o maior sucesso no tratamento com vareniclina nos indivíduos portadores do alelo G para o rs8109525 tange as seguintes evidências: a menor expressão gênica da isoenzima CYP2B6; o possível desequilíbrio de ligação com polimorfismos preditores de metabolização lenta e as concentrações cerebrais menos variáveis de nicotina em metabolizadores lentos.

6.2 Estudo da RMN

O uso do tabaco ainda é um problema de saúde pública global e continua a representar a maior causa de morte evitável, sendo responsável por quase 30% da mortalidade relacionada ao câncer nos EUA[73]. Atualmente, medicamentos aprovados para a cessação tabágica, como a bupropiona e a vareniclina, têm uma taxa de sucesso de cerca de um terço dos pacientes[74–76] enquanto a terapia de reposição de nicotina apresenta taxas de 20 a 25%[77]. Nesse contexto, onde apenas cerca de um terço dos pacientes obtém sucesso com o tratamento, o uso de estratégias que permitem o tratamento individualizado, como aquelas que consideram fatores genéticos e/ou individuais, pode ser capaz de aumentar as taxas de sucesso[47].

A RMN foi validada como uma ferramenta para selecionar o tratamento ideal para fumantes para garantir os melhores resultados possíveis[78], pois espera-se que a relação 3HC/CO reflita a atividade do CYP2A6. Portanto, é possível inferir que quanto maior a atividade do CYP2A6, maior a ingestão de nicotina para manter os níveis desejados da substância no organismo, o que, consequentemente, levaria à necessidade de fumar mais cigarros[18].

A relação entre a RMN e a resposta ao tratamento farmacológico do tabagismo pode ser mediada pela variabilidade na recompensa neurobiológica da nicotina. Metabolizadores rápidos de nicotina têm maior disponibilidade de receptores nicotínicos, o que leva ao aumento da atividade cerebral em resposta ao tabagismo e maior recompensa subjetiva. Esses pacientes apresentam mais sinais e sintomas de dependência de nicotina e titular sua dose de nicotina fumando mais cigarros por dia[78] Nossa análise não conseguiu identificar diferenças entre metabolizadores lentos e rápidos ou normais em relação ao número de cigarros fumados por dia - uma média

de 20 cigarros foi identificada em ambos os grupos. No entanto, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de cigarros fumados por dia e a concentração de CO e 3HC. Esses dados corroboram estudos que mostram maior confiança nas medidas de RMN de amostras de plasma[79].

Em nosso estudo, 29,7% dos pacientes foram classificados como metabolizadores lentos de acordo com a RNM e não foram encontradas diferenças significativas entre a RNM e as características gerais. Alguns estudos também não conseguiram demonstrar associações significativas entre RMN e sexo, idade ou raça[80–82]. Por outro lado, há evidências de que maior RMN foi associado ao sexo feminino, raça branca, número de cigarros por dia e medidas de dependência de nicotina[83].

Em relação à resposta ao tratamento farmacológico, estudos mostraram que a bupropiona aumentou significativamente as taxas de abandono entre metabolizadores rápidos de nicotina, mas não forneceu nenhum benefício adicional para metabolizadores lentos[84]. Embora não tenha sido possível detectar diferenças significativas, nosso estudo constatou que apenas 14,3% dos metabolizadores lentos tratados com bupropiona obtiveram sucesso após 12 semanas de tratamento. Esta foi a menor taxa de sucesso entre os metabolizadores lentos encontrados em nossa análise. Outros estudos também mostraram maior taxa de sucesso entre metabolizadores rápidos quando tratados com vareniclina, sugerindo que as terapias de reposição de nicotina são o tratamento mais adequado para metabolizadores lentos[49,58].

Shahab *et al.* não conseguiu demonstrar diferenças entre vareniclina e terapia TRN de acordo com a RMN em um cenário real. Alguns fatores devem ser considerados ao tentar replicar resultados de ensaios clínicos em estudos do mundo real, como diferenças sociodemográficas e variações étnicas entre os participantes incluídos em ensaios clínicos randomizados e estudos populacionais. Além disso, o acompanhamento rigoroso do tratamento e adesão é muitas vezes difícil de realizar fora de um ambiente controlado. Finalmente, os ensaios clínicos terão como objetivo maximizar o acompanhamento da resposta para obter uma estimativa precisa do efeito do tratamento, considerando que as taxas de acompanhamento em estudos populacionais como o nosso geralmente tendem a ser menores, resultando potencialmente em efeitos subestimativos do tratamento no contexto da análise da intenção de tratar[85].

Existe uma variação substancial na resposta ao tratamento farmacológico para a cessação do tabagismo. Evidências sugerem que fatores individuais e ambientais podem contribuir para essas diferenças. A RMN provou ser uma ferramenta útil que contribui para melhores respostas farmacológicas. Em um contexto de medicina personalizada, a RMN poderia ser aplicada na prática clínica, em que fosse possível quantificar analitos e calcular a RMN na consulta médica, para que a melhor medicação para cada paciente fosse selecionada. Infelizmente, devido ao tamanho da amostra, não conseguimos demonstrar associações significativas entre a RNM e as características gerais ou o resultado do tratamento farmacológico, sendo essa a principal limitação do nosso estudo. No entanto, acreditamos que o uso da RMN apresenta grande potencial e pode ter um efeito sinérgico na cessação do tabagismo, juntamente com novas abordagens comportamentais para aumento da adesão e ferramentas farmacogenéticas, devendo ser foco de pesquisas futuras nessa área.

7 CONCLUSÕES

Foi possível identificar polimorfismos associados com uma maior taxa de sucesso no tratamento antitabagismo com vareniclina. Além disso, fomos capazes de avaliar a RMN e observar categorias de metabolizadores em pacientes brasileiros sob tratamento farmacológico. Assim, este estudo pode contribuir para a indicação de estratégias que possam fazer parte da customização dos tratamentos antitabagismo e, consequentemente, melhorar as taxas de sucesso no processo de cessação do tabagismo.

REFERÊNCIAS[1]

1. Institute of Health Metrics. Global Burden of Disease [database]. 2019 [cited 2022 Feb 16]; Available from: https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/tobacco-level-2-risk
2. World Health Organization. Tabaco [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 31]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco
3. Centers for Disease Control and Prevention. Tobacco Use [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 31]. Available from: https://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/factsheets/tobacco.htm
4. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti D v, et al. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2012 Feb;37(3):641–50. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048466
5. World Health Organization. WHO REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2021: Addressing new and emerging products fresh and alive. Geneva; 2021.
6. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. JAMA [Internet]. 2014 Jan 8 [cited 2022 Mar 31];311(2):183–92. Available from: https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1812960
7. Monteiro CA, Cavalcante TM, Moura EC, Claro RM, Szwarcwald CL. Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989-2003). Bull World Health Organ. 2007 Jul;85(7):527–34.
8. IBGE - Pesquisa Nacional de Saúde. Pessoas de 18 anos ou mais de idade usuários atuais de produtos derivados do tabaco, por sexo e situação do domicílio [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 31]. Available from: https://sidra.ibge.gov.br/tabela/4162
9. Russo P, Cesario A, Rutella S, Veronesi G, Spaggiari L, Galetta D, et al. Impact of genetic variability in nicotinic acetylcholine receptors on nicotine addiction and smoking cessation treatment. Curr Med Chem [Internet]. 2011 Dec 23 [cited

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

2022 Mar 31];18(1):91–112. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21110812/

10. 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 [Internet]. 1997 Oct [cited 2022 Mar 31];62(4):453–63. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9357397/
11. Rose JE, Mukhin AG, Lokitz SJ, Turkington TG, Herskovic J, Behm FM, et al. 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 [Internet]. 2010 Mar 16 [cited 2022 Mar 31];107(11):5190–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20212132/
12. Brody AL, Mandelkern MA, London ED, Olmstead RE, Farahi J, Scheibal D, et al. Cigarette Smoking Saturates Brain α4 β2 Nicotinic Acetylcholine Receptors. Arch Gen Psychiatry [Internet]. 2006 [cited 2022 Mar 31];63(8):907. Available from: /pmc/articles/PMC2773659/
13. Henningfield JE, Slade J. Tobacco-dependence medications: public health and regulatory issues. Food Drug Law J. 1998;53 suppl:75–114.
14. Laviolette SR, van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nature Reviews Neuroscience 2004 5:1 [Internet]. 2004 [cited 2022 Mar 31];5(1):55–65. Available from: https://www.nature.com/articles/nrn1298
15. Oates JA, Wood AJJ, Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. N Engl J Med [Internet]. 1988 Nov 17 [cited 2022 Mar 31];319(20):1318–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3054551/
16. Laucht M, Becker K, Frank J, Schmidt MH, Esser G, Treutlein J, et al. Genetic variation in dopamine pathways differentially associated with smoking progression in adolescence. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry [Internet]. 2008 [cited 2022 Mar 31];47(6):673–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18434921/
17. Leonard S, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. Nicotine Tob Res [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2022 Mar 31];3(3):203–23. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11506765/

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

18. Allenby CE, Boylan KA, Lerman C, Falcone M. Precision Medicine for Tobacco Dependence: Development and Validation of the Nicotine Metabolite Ratio. Journal of Neuroimmune Pharmacology [Internet]. 2016;471–86. Available from: http://www.cypalleles.ki.se
19. Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-Oxidation by Human Liver Microsomes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1997;282(3).
20. Tanaka E. Clinically important pharmacokinetic drug–drug interactions: role of cytochrome P450 enzymes. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics [Internet]. 1998 Dec 1 [cited 2022 Mar 31];23(6):403–16. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2710.1998.00086.x
21. Mamoun M, Bergen AW, Shieh J, Wiggins A, Brody AL. Biomarkers of Response to Smoking Cessation Pharmacotherapies: Progress to Date. CNS Drugs [Internet]. 2015 May;29(5):359–69. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895022
22. Benowitz NL, Jacob P. Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. Br J Clin Pharmacol [Internet]. 2001 Jan;51(1):53–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167665
23. Fiore M, Jaén CR, Baker TB, Bailey W, Bennett G, Benowitz NL, et al. A Clinical Practice Guideline for Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update: A U.S. Public Health Service Report The Clinical Practice Guideline Treating Tobacco Use and Dependence 2008 Update Panel, Liaisons, and Staff. 2008; Available from: www.ahrq.gov
24. Piné-Abata H, Mcneill A, Murray R, Bitton A, Rigotti N, Raw M. A survey of tobacco dependence treatment services in 121 countries. Addiction (Abingdon, England) [Internet]. 2013 Aug [cited 2022 Mar 31];108(8):1476–84. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23451932/
25. Kasza KA, Hyland AJ, Borland R, McNeill AD, Bansal-Travers M, Fix B v., et al. Effectiveness of Stop-Smoking Medications: Findings from the International Tobacco Control (ITC) Four Country Survey. Addiction (Abingdon, England) [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 Mar 31];108(1):193. Available from: /pmc/articles/PMC3500450/

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

26. Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI. Bupropion Is a Nicotinic Antagonist. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2000;295(1).
27. Burke M v., Hays JT, Ebbert JO. Varenicline for smoking cessation: a narrative review of efficacy, adverse effects, use in at-risk populations, and adherence. Patient Prefer Adherence [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Mar 31];10:435. Available from: /pmc/articles/PMC4824380/
28. Wu Q, Gilbody S, Peckham E, Brabyn S, Parrott S. Varenicline for smoking cessation and reduction in people with severe mental illnesses: systematic review and meta-analysis. Addiction (Abingdon, England) [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Mar 31];111(9):1554–67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27043328/
29. Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. Rev Physiol Biochem Pharmacol [Internet]. 2003 [cited 2022 Mar 31];147:1–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12783266/
30. Zoli M, Léna C, Picciotto MR, Changeux JP. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. J Neurosci [Internet]. 1998 Jun 15 [cited 2022 Mar 31];18(12):4461–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9614223/
31. Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, et al. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science [Internet]. 2004 Nov 5 [cited 2022 Mar 31];306(5698):1029–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15528443/
32. Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW. Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. Mol Pharmacol [Internet]. 2006 [cited 2022 Mar 31];70(3):801–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16766716/
33. Swan GE, Javitz HS, Jack LM, Wessel J, Michel M, Hinds DA, et al. Varenicline for smoking cessation: nausea severity and variation in nicotinic receptor genes. Pharmacogenomics J [Internet]. 2012 Aug [cited 2022 Mar 31];12(4):349–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21606948/
34. Scott Obach R, Reed-Hagen AE, Krueger SS, Obach BJ, O'Connell TN, Zandi KS, et al. Metabolism and disposition of varenicline, a selective alpha4beta2

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

acetylcholine receptor partial agonist, in vivo and in vitro. Drug Metab Dispos [Internet]. 2006 Jan [cited 2022 Mar 31];34(1):121–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16221753/

35. Feng B, Obach RS, Burstein AH, Clark DJ, de Morais SM, Faessel HM. Effect of human renal cationic transporter inhibition on the pharmacokinetics of varenicline, a new therapy for smoking cessation: an in vitro-in vivo study. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 Mar 31];83(4):567–76. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17971819/
36. Faessel HM, Gibbs MA, Clark DJ, Rohrbacher K, Stolar M, Burstein AH. Multiple-dose pharmacokinetics of the selective nicotinic receptor partial agonist, varenicline, in healthy smokers. J Clin Pharmacol [Internet]. 2006 Dec [cited 2022 Mar 31];46(12):1439–48. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17101743/
37. Arias HR. Molecular interaction of bupropion with nicotinic acetylcholine receptors. Journal of Pediatric Biochemistry [Internet]. 2010 Jul 28 [cited 2022 Mar 31];1(2):185–97. Available from: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1586365
38. Foulds J, Burke M, Steinberg M, Williams JM, Ziedonis DM. Advances in pharmacotherapy for tobacco dependence. Expert Opin Emerg Drugs [Internet]. 2004 [cited 2022 Mar 31];9(1):39–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15155135/
39. Hughes JR, Lindgren PG, Connett JE, Nides MA. Smoking reduction in the Lung Health Study. Nicotine & Tobacco Research [Internet]. 2004;6(2):275–80. Available from: http://www.jstor.org/stable/26760010
40. Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. Hum Mol Genet [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2022 Feb 16];16(1):36–49. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135278/
41. Verde Z, Santiago C, González-Moro JMR, de Lucas Ramos P, Martín SL, Bandrés F, et al. ‘Smoking Genes’: A Genetic Association Study. PLOS ONE [Internet]. 2011 [cited 2022 Mar 31];6(10):e26668. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026668

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

42. Broms U, Silventoinen K, Madden PAF, Heath AC, Kaprio J. Genetic architecture of smoking behavior: a study of Finnish adult twins. Twin Res Hum Genet [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Mar 31];9(1):64–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611469/

43. Lessov CN, Martin NG, Statham DJ, Todorov AA, Slutske WS, Bucholz KK, et al. Defining nicotine dependence for genetic research: Evidence from Australian twins. Psychological Medicine. 2004 Jul;34(5):865–79.

44. Bloom AJ, Martinez M, Chen LS, Bierut LJ, Murphy SE, Goate A. CYP2B6 Non-Coding Variation Associated with Smoking Cessation Is Also Associated with Differences in Allelic Expression, Splicing, and Nicotine Metabolism Independent of Common Amino-Acid Changes. PLOS ONE [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2022 Mar 31];8(11):e79700. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079700

45. Lerman CE, Schnoll RA, Munafò MR. Genetics and smoking cessation improving outcomes in smokers at risk. Am J Prev Med [Internet]. 2007 Dec [cited 2022 Mar 31];33(6 Suppl). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18021915/

46. Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Lyons MJ, Tsuang M, True WR, et al. The heritability of failed smoking cessation and nicotine withdrawal in twins who smoked and attempted to quit. Nicotine & Tobacco Research. 2003;5(2):245–54.

47. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti D v., et al. Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Mar 2];37(3):641–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22048466/

48. Chatkin JM. The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. J Bras Pneumol [Internet]. 2006;32(6):573–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435909

49. Glatard A, Dobrinas M, Gholamrezaee M, Lubomirov R, Cornuz J, Csajka C, et al. Association of nicotine metabolism and sex with relapse following varenicline and nicotine replacement therapy. Experimental and Clinical

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

Psychopharmacology [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Mar 2];25(5):353–62. Available from: /record/2017-47030-004

50. Chenoweth MJ, Tyndale RF. Pharmacogenetic Optimization of Smoking Cessation Treatment. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2017;38(1):55–66. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27712845
51. Schnoll RA, Patterson F, Wileyto EP, Tyndale RF, Benowitz N, Lerman C. Nicotine metabolic rate predicts successful smoking cessation with transdermal nicotine: a validation study. Pharmacol Biochem Behav [Internet]. 2009 Mar [cited 2022 Feb 16];92(1):6–11. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19000709/
52. Dempsey D, Tutka P, Jacob P, Allen F, Schoedel K, Tyndale RF, et al. Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2004 Jul [cited 2022 Feb 16];76(1):64–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15229465/
53. Lerman C, Tyndale R, Patterson F, Wileyto EP, Shields PG, Pinto A, et al. Nicotine metabolite ratio predicts efficacy of transdermal nicotine for smoking cessation. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2006 [cited 2022 Feb 16];79(6):600–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16765148/
54. Ho MK, Mwenifumbo JC, al Koudsi N, Okuyemi KS, Ahluwalia JS, Benowitz NL, et al. Association of nicotine metabolite ratio and CYP2A6 genotype with smoking cessation treatment in African-American light smokers. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2009 Jun [cited 2022 Feb 16];85(6):635–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19279561/
55. Lerman C, Jepson C, Wileyto EP, Patterson F, Schnoll R, Mroziewicz M, et al. Genetic variation in nicotine metabolism predicts the efficacy of extended-duration transdermal nicotine therapy. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2010 May;87(5):553–7. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336063
56. Schnoll RA, Wileyto EP, Leone FT, Tyndale RF, Benowitz NL. High dose transdermal nicotine for fast metabolizers of nicotine: a proof of concept placebo-controlled trial. Nicotine Tob Res [Internet]. 2013 Feb;15(2):348–54. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589423

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

57. Patterson F, Schnoll RA, Wileyto EP, Pinto A, Epstein LH, Shields PG, et al. Toward personalized therapy for smoking cessation: a randomized placebo-controlled trial of bupropion. Clin Pharmacol Ther [Internet]. 2008 Sep;84(3):320–5. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388868
58. Lerman C, Schnoll RA, Hawk LW, Cinciripini P, George TP, Wileyto EP, et al. Use of the nicotine metabolite ratio as a genetically informed biomarker of response to nicotine patch or varenicline for smoking cessation: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. The Lancet Respiratory Medicine. 2015 Feb 1;3(2):131–8.
59. Chenoweth MJ, Novalen M, Hawk LW, Schnoll RA, George TP, Cinciripini PM, et al. Known and novel sources of variability in the nicotine metabolite ratio in a large sample of treatment-seeking smokers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev [Internet]. 2014 Sep;23(9):1773–82. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012994
60. Schnoll RA, George TP, Hawk L, Cinciripini P, Wileyto P, Tyndale RF. The relationship between the nicotine metabolite ratio and three self-report measures of nicotine dependence across sex and race. Psychopharmacology (Berl) [Internet]. 2014 Jun;231(12):2515–23. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402139
61. Hiroi N, Scott D. Constitutional mechanisms of vulnerability and resilience to nicotine dependence. Mol Psychiatry [Internet]. 2009 Jul [cited 2022 Jul 20];14(7):653–67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19238150/
62. 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 [Internet]. 2008 Apr [cited 2022 Jul 20];17(7):884–90. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18321287/
63. Piper ME, McCarthy DE, Baker TB. Assessing tobacco dependence: a guide to measure evaluation and selection. Nicotine Tob Res [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Jul 20];8(3):339–51. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16801292/
64. Fagerstrom KO, Heatherton TF, Kozlowski LT. Nicotine addiction and its assessment. Ear Nose Throat J. 1990 Nov;69(11):763–5.

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

65. Issa JS. A new nicotine dependence score and a new scale assessing patient comfort during smoking cessation treatment. Jornal Brasileiro de Pneumologia [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 20];38(6):761–5. Available from: http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132012000600012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
66. Thermo Fisher Scientific. TaqMan ® Advanced miRNA Assays Single-tube assays for use with: TaqMan ® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit Catalog Number A25576. 2016.
67. Pérez-Rubio G, López-Flores LA, Ramírez-Venegas A, Noé-Díaz V, García-Gómez L, Ambrocio-Ortiz E, et al. Genetic polymorphisms in CYP2A6 are associated with a risk of cigarette smoking and predispose to smoking at younger ages. Gene [Internet]. 2017 Sep;628:205–10. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28734893
68. Abdallah IA, Hammell DC, Stinchcomb AL, Hassan HE. A fully validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of nicotine and its metabolite cotinine in human serum and its application to a pharmacokinetic study after using nicotine transdermal delivery systems with standard heat application in adult smokers. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2016 May;1020:67–77. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27023159
69. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. J Anal Toxicol [Internet]. 2013 Sep;37(7):452–74. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934984
70. United Nations Office on Drugs and Crime. Laboratory and Scientific Section. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens : a commitment to quality and continuous improvement. United Nations; 2009. 67 p.
71. Tang DW, Hello B, Mroziewicz M, Fellows LK, Tyndale RF, Dagher A. Genetic variation in CYP2A6 predicts neural reactivity to smoking cues as measured using fMRI. Neuroimage [Internet]. 2012 May;60(4):2136–43. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22342802

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

72. Sofuoglu M, Herman AI, Nadim H, Jatlow P. Rapid nicotine clearance is associated with greater reward and heart rate increases from intravenous nicotine. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2012 May;37(6):1509–16. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334123

73. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Lin CC, Coebergh JWW, Jemal A. U.S. Burden of Cancer by Race and Ethnicity According to Disability-Adjusted Life Years. American Journal of Preventive Medicine. 2016 Nov 1;51(5):673–81.

74. Cahill K, Stevens S, Perera R, Lancaster T. Pharmacological interventions for smoking cessation: An overview and network meta-analysis. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2013 May 31 [cited 2022 Mar 2];2013(5). Available from: https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009329.pub2/full

75. Hartmann-Boyce J, Stead LF, Cahill K, Lancaster T. Efficacy of interventions to combat tobacco addiction: Cochrane update of 2013 reviews. Addiction [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Mar 2];109(9):1414–25. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/add.12633

76. Kotz D, Brown J, West R. ‘Real-world’ effectiveness of smoking cessation treatments: a population study. Addiction [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 Mar 2];109(3):491–9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/add.12429

77. Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Hartmann-Boyce J, Cahill K, et al. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2012 Nov 14 [cited 2022 Mar 2];2017(12). Available from: https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000146.pub4/full

78. Siegel SD, Lerman C, Flitter A, Schnoll RA. The Use of the Nicotine Metabolite Ratio as a Biomarker to Personalize Smoking Cessation Treatment: Current Evidence and Future DirectionsPersonalized Treatment for Smoking. Cancer Prevention Research [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Mar 2];13(3):261–72. Available from: https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/13/3/261/47339/The-Use-of-the-Nicotine-Metabolite-Ratio-as-a

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

79. Tanner JA, Novalen M, Jatlow P, Huestis MA, Murphy SE, Kaprio J, et al. Nicotine metabolite ratio (3-Hydroxycotinine/Cotinine) in plasma and urine by different analytical methods and laboratories: Implications for clinical implementation. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Mar 5];24(8):1239–46. Available from: https://aacrjournals.org/cebp/article/24/8/1239/115567/Nicotine-Metabolite-Ratio-3-Hydroxycotinine

80. St.Helen G, Benowitz NL, Ahluwalia JS, Tyndale RF, Addo N, Gregorich SE, et al. Black Light Smokers: How Nicotine Intake and Carcinogen Exposure Differ Across Various Biobehavioral Factors. J Natl Med Assoc [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Feb 24];111(5):509–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31084916/

81. Verplaetse TL, Peltier MR, Roberts W, Moore KE, Pittman BP, McKee SA. Associations Between Nicotine Metabolite Ratio and Gender With Transitions in Cigarette Smoking Status and E-Cigarette Use: Findings Across Waves 1 and 2 of the Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) Study. Nicotine & Tobacco Research [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2022 Feb 24];22(8):1316–21. Available from: https://academic.oup.com/ntr/article/22/8/1316/5802027

82. Vogel EA, Benowitz NL, Skan J, Schnellbaecher M, Prochaska JJ. Correlates of the nicotine metabolite ratio in Alaska Native people who smoke cigarettes. Exp Clin Psychopharmacol [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 24]; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33856821/

83. Chen A, Krebs NM, Zhu J, Muscat JE. Nicotine metabolite ratio predicts smoking topography: The Pennsylvania Adult Smoking Study. Drug Alcohol Depend [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Feb 24];190:89–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29990649/

84. Patterson F, Schnoll RA, Wileyto EP, Pinto A, Epstein LH, Shields PG, et al. Toward Personalized Therapy for Smoking Cessation: A Randomized Placebo-controlled Trial of Bupropion. Clinical Pharmacology & Therapeutics [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2022 Mar 2];84(3):320–5. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/clpt.2008.57

85. Shahab L, Bauld L, McNeill A, Tyndale RF. Does the nicotine metabolite ratio moderate smoking cessation treatment outcomes in real-world settings? A

[1] De acordo com o Estilo Vancouver

prospective study. Addiction (Abingdon, England) [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 Jun 20];114(2):304. Available from: /pmc/articles/PMC6492100/

[1]De acordo com o Estilo Vancouver.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE 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 DA PESQUISA: "**Avaliação de Custo-Efetividade da Utilização de Marcadores Genéticos na Escolha do Tratamento Farmacológica do Tabagismo**"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Jaqueline Scholz
CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente, Médico Pesquisador – InCor – HCFMUSP CRM SP Nº 60.179
UNIDADE DO HC-FMUSP: Programa Ambulatorial de Tratamento Tabagismo INCOR-HCFMUSP.

2.PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra Patricia Viviane Gaya
CARGO/FUNÇÃO: medica cardiologista pesquisadora

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: **4 anos**

Convite a participação

Você está sendo convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa. Este projeto tem como objetivos principais comparar a eficácia do uso de marcadores genéticas favoráveis ao tratamento com medicamentos antitabaco (vareniclina e bupropiona) versus a escolha do medicamento mais potente (vareniclina) e eventualmente sua associação com bupropiona a partir de 4 semana para obtenção da cessação completa do tabagismo ou quando o escore PAF (que avalia o conforto ao tratamento) estiver menor ou igual a 20. Algumas pessoas **respondem muito** bem aos medicamentos antitabagismo, enquanto outras pessoas **não respondem tão bem** e consequentemente não conseguem parar de fumar. Para avaliarmos o efeito da utilização de marcadores genéticos, 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. Com sua amostra sanguínea também analisaremos como esta a metabolização de nicotina. 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, 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. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. squisador responsável é a Dra Jaqueline Scholz , que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Instituto do Coração, Bloco 2, andar 1, **Programa Ambulatorial de Tratamento Tabagismo INCOR-HCFMUSP**., telefone (11) 2661-5592.

Rubrica participante **Rubrica pesquisador**

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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Poderá também solicitar a destruição das amostras de DNA que estarão armazenadas no mesmo laboratório.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Não haverá nenhuma despesa por parte do participante para coleta genética. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Benefício direto para o participante é a possibilidade de parar de fumar e ser bem monitorado durante todo o processo de 12 semanas.

Estas informações poderão auxiliar 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 de Custo-Efetividade da Utilização de Marcadores Genéticos na Escolha do Tratamento Farmacológica do Tabagismo**" Eu discuti com o Dr. Jaqueline Scholz e/ou com a Dra Patricia Viviane Gaya 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.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento. No entanto, a Equipe do Estudo ressalta que interromper o tratamento, e não vir as consultas reduz a taxa de sucesso no tratamento do tabagismo, diminuindo as chances reais de parar de fumar.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do pesquisador Data ___/___/___

Assinatura do pesquisador executante Data ___/___/___

Rubrica participante **Rubrica pesquisador**

ANEXO B - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

4345/16/007

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE CUSTO-EFETIVIDADE DA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS NA ESCOLHA DO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TABAGISMO

Pesquisador: Jaqueline Ribeiro Scholz

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 60133816.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.118.913

Apresentação do Projeto:

Submissão de subprojeto "Análise da associação dos perfis de Expressão Gênica, dos genótipos preditores de metabolização e das concentrações de Metabólitos com a resposta ao Tratamento Antitabagismo" Serão incluídos no estudo 300 indivíduos fumantes provenientes do Programa Ambulatorial de Tratamento do Tabagismo (software PAF) do InCor do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), com idade 18.Os pacientes selecionados serão randomizados em duas abordagens: abordagem farmacogenética e abordagem tradicional. A abordagem farmacogenética (n=150) consistirá na escolha do tratamento farmacológico conforme os genótipos apresentados para os polimorfismos CYP2B6 rs2279343 e CHRNA4 rs1044396 (maiores detalhes do tratamento no tópico "Protocolo de tratamento farmacológico"). A abordagem tradicional (n=150) consistirá no tratamento farmacológico com vareniclina, conforme já estabelecido no programa (Figura 1).O tratamento farmacológico de ambas abordagens será conduzido por 12 semanas e serão considerados desfechos de sucesso no tratamento: a abstinência contínua ao tabaco (ACT) nas 4ª e 12ª semanas. Os pacientes tratados com vareniclina, provenientes de ambas abordagens de tratamento farmacológico, poderão receber a coadministração de bupropiona se não pararem de fumar após 4 semanas de tratamento

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

RECEBIDO
COMISSÃO CIENTÍFICA
26/17

ANEXO C - 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.

ANEXO D – Artigo publicado na *European Journal of Clinical Pharmacology*, volume 75, páginas 1541–1545 (2019).

European Journal of Clinical Pharmacology
https://doi.org/10.1007/s00228-019-02731-z

PHARMACOGENETICS

Cytochrome P450 2A6 and 2B6 polymorphisms and smoking cessation success in patients treated with varenicline

Paulo Roberto Xavier Tomaz[1] · Mariana Soares Kajita[2] · Juliana Rocha Santos[1] · Jaqueline Scholz[3] · Tânia Ogawa Abe[3] · Patrícia Viviane Gaya[3] · José Eduardo Krieger[1] · Alexandre Costa Pereira[1] · Paulo Caleb Júnior Lima Santos[2]

Received: 22 March 2019 / Accepted: 26 July 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Background The identification of variants in genes involved in nicotine metabolism may have implications for the pharmacological therapy of smoking. In the scenario of precision medicine, the aim of this study was to evaluate a possible association of cytochrome P450 2A6 and 2B6 polymorphisms with varenicline pharmacotherapy.

Methods The present study included 167 patients treated with varenicline in monotherapy who were from a cohort study of 1049 patients (treated with smoking cessation drugs: nicotine replacement therapy, bupropion, varenicline, or combinations of same). Smoking cessation success was considered for patients who completed 6 months of continuous abstinence. The *CYP2A6* rs1801272 and rs28399433 and *CYP2B6* rs8109525 polymorphisms were genotyped by real-time PCR using the TaqMan® platform.

Results Patients with AG or GG genotypes for *CYP2B6* rs8109525 had a higher success rate of smoking cessation with varenicline (51.2%) compared with carriers of the AA genotypes (33.3%, $P = 0.03$, $n = 167$). The AG or GG genotypes were also associated with a higher odds ratio of success, even in a multivariate analysis adjusting for potential confounders (OR = 2.01; 95%CI = 1.01 to 4.00; $P = 0.047$).

Conclusion *CYP2B6* rs8109525 was associated with a higher success rate of smoking cessation with varenicline treatment. This finding may be useful in pharmacogenomic strategies for smoking cessation therapy.

Keywords *CYP2A6* · *CYP2B6* · Nicotine metabolism · Smoking cessation · Polymorphism · rs8109525

Background

Smoking was documented as a cause of health problems for the first time in the 1950s. Since then, it has been associated with higher risk of cancers, cardiovascular diseases, lung disorders and stroke, becoming not only the main cause of preventable death in the world, but also one of the five main risk factors that influence the disability-adjusted life year (DALY), calculated as the sum of the years of life lost (YLL) due to premature mortality in the population and the years lost due to disability (YLD) for people living with a health condition or its consequences [1, 2].

It is known, however, that the annual number of deaths from diseases related to smoking could reach 10 million in 2020 if current trends continue, which would be double in comparison to values in the 2000s [3, 4]. Despite serious health consequences due to tobacco use, there is great difficulty in smoking cessation because the presence of addictive substances, mainly nicotine, often causing relapse during smoking treatment programs [5–7].

In Brazil, the first-line pharmacological treatment consists of nicotine replacement therapy (NRT), bupropion (an inhibitor of the reuptake of norepinephrine and dopamine, with little effect on serotonin reuptake and an antagonist nAChR)

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00228-019-02731-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Paulo Caleb Júnior Lima Santos
paulo.caleb@unifesp.b

[1] Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Instituto do Coracao (InCor), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

[2] Department of Pharmacology—Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo EPM-Unifesp, São Paulo, Brazil

[3] Smoking Cessation Program Department, Instituto do Coracao (InCor), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Published online: 11 August 2019

and varenicline (a partial agonist of nicotinic acetylcholine receptor—nAChR—especially on α4β2 subunit). The latter drug is considered the most effective [8–10].

To understand cigarette smoking better, we need to understand the stages: initiation, experimentation, regular use, dependence, cessation, and relapse (or otherwise) [11, 12]. Genetics can be one of the key parts on how patients differ in each stage, possibly responsible for 40 to 60% of the variability of initial addiction risk and, in this context, studies that identify genetic biomarkers for pharmacological therapy may be useful in smoking cessation [11–16].

Regarding the process of nicotine metabolism in the liver, there are cytochrome P450 isoenzymes that have been frequently associated with its metabolization rate. *CYP2A6* is the main gene in determining whether patients are fast or slow metabolizers of nicotine. However, the *CYP2B6* gene encodes an isoenzyme which also metabolizes nicotine, and its genetic variants might have an impact on the pharmacotherapy of patients using varenicline. In addition, the latter gene has been specifically associated with bupropion therapy, because it also metabolizes this drug [17–19]. Genetic variants in the *CYP2A6* gene were chosen because it is the main gene involved in the process of metabolizing nicotine. For the *CYP2B6* gene, the choice of rs8109525 was based on previous significant associations identified in King et al.'s study [20], with smoking cessation in patients treated with and without bupropion treatment.

Focusing on precision medicine, the main aim of this study was to evaluate a possible association of cytochrome P450 2A6 and 2B6 polymorphisms with varenicline pharmacotherapy.

Methods

Study population

The present study included 167 patients treated with varenicline in monotherapy who were from a cohort study of 1049 patients (treated with smoking cessation drugs: nicotine replacement therapy, bupropion, varenicline, or combinations of same). These 167 patients were selected for genotyping and they had 6 months of follow-up. They were selected from the smoking assistance program (PAF), Instituto do Coracao (InCor), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil. Written informed consent was obtained from all participants prior to entering the study (CAPPESQ no. 0022/11—SDC: 3579/10/168). Data from patients who had an outcome in smoking treatment were obtained from the PAF database [21]. Inclusion criteria were patients over 18 years of age who were to start smoking cessation treatment. Exclusion criteria were the presence of hepatic and kidney comorbidities.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood following a standard salting-out procedure. The genotyped polymorphisms were as follows: *CYP2A6* rs1801272 (g.41354533T>A), Leu>His; *CYP2A6* rs28399433 (g.41356379T>G), TATA box; and *CYP2B6* rs8109525 (g.41491918A>G), non-coding region. They were genotyped by real-time PCR using the TaqMan® platform (Applied Biosystems, CA, USA), through the 7500 Fast Real-Time PCR System. During PCR, each probe hybridizes specifically to its complementary sequence between the forward and reverse primer sites. DNA polymerase is only capable of cleaving probes that hybridize to its specific SNP allele. The cleavage separates the reporter dye from the extinguishing dye, substantially increasing the fluorescence of the reporter dye. Thus, fluorescence signals generated during PCR amplification indicate that the alleles are present in the sample. Then, the reading is made by fluorescence capture.

Statistical analysis

Continuous variables were presented as mean and standard deviation and categorical variables as frequencies. Chi-square or Fisher tests were performed for the comparative analyses of categorical variables, of treatment outcomes according to the *CYP2A6* and *CYP2B6* gene polymorphisms and Hardy–Weinberg equilibrium analysis. Student's *t* test or Mann-Whitney test was used to compare continuous variables according to the polymorphisms. Multiple logistic regression models were used to assess the odds ratio (OR) of success according to genotypes, in a dominant model (considering the presence of the risk allele). The covariates used in the models were age, self-declared race/color (white), gender (male), and the Fagerström test for nicotine dependence (FTND score). Another model, which included the following variables, was performed: myocardial infarction, arterial coronary disease, and education level. The dominant model was chosen based on previous studies: *CYP2A6* rs1801272 (TT vs TA + AA), *CYP2A6* rs28399433 (AA vs AC + CC), and *CYP2B6* rs8109525 (AA vs AG + GG) [22, 23]. Statistical analysis was performed on IBM SPSS Statistics 20 software, with significance level of $P \leq 0.05$.

Results

General, dinical, and genetic characteristics of patients

Table 1 shows the general and clinical characteristics of patients submitted to varenicline therapy. In addition,

Table 1 Clinical and demographic characteristics of patients submitted to varenicline treatment ($n = 167$)

Age (years)	52 ± 10
Gender, female (%)	57.2
Self-declared race/color, white (%)	83.6
Body mass index (kg/m^2)	27 ± 4
FTND	7.0 ± 2.6
FTND ≥ 6 (%)	78.0
Educational level, university (%)	64.8
Hypertension (%)	47.2
ACD (%)	9.6
AMI (%)	10.8
Dyslipidemia (%)	56.2
Diabetes mellitus type 2 (%)	11.7
Depression (%)	18.7
Anxiety (%)	12.0
Chronic obstructive pulmonary disease (%)	10.8
Asthma (%)	1.8
Number of diagnosed diseases	1.8 ± 1.4

FTND, Fagerström test for nicotine dependence (scale from 0 to 10 points); *ACD*, arterial coronary disease; *AMI*, acute myocardial infarction

supplementary table 1 shows the same variables according to genotypes for the *CYP2B6* rs8109525 polymorphism.

The frequencies of *CYP2A6* rs1801272 A, *CYP2A6* rs283994433 C, and *CYP2B6* rs8109525 G alleles were 1.9%, 6.5%, and 31.2% respectively. The genotypic distributions for the rs1801272 and rs8109525 polymorphisms were in accordance with Hardy–Weinberg equilibrium ($X^2 = 0.06$, $P = 0.81$ and $X^2 = 1.0$, $P = 0.32$, respectively). The rs283994433 was not consistent with Hardy–Weinberg equilibrium ($X^2 = 10.6$, $P = 0.001$).

Success rate of smoking cessation according to genotypes

Table 2 shows success rates of treatment with varenicline according to genotypes. For the *CYP2B6* rs8109525 polymorphism, patients with AG or GG genotype had a higher success rate when compared with patients carrying the genotypes AA.

Table 2 Success rate according to genotypes for the *CYP2A6* and *CYP2B6* polymorphisms

Polymorphisms	Success rate (%)		*P* value
CYP2A6 rs1801272	TT	TA or AA	
	43.0	50.0	0.52
CYP2A6 rs28399433	AA	AC or CC	
	41.4	43.8	0.86
CYP2B6 rs8109525	AA	AG or GG	
	33.3	51.2	0.03

CYP2A6 polymorphisms did not show significant associations. Table 3 shows a multiple logistic regression for successful smoking cessation for patients submitted to varenicline treatment ($n = 167$) for the *CYP2B6* rs8109525 polymorphism. The AG or GG genotypes for the rs8109525 were associated with a higher odds ratio of success (OR = 2.01; 95% CI = 1.01 to 4.00; $P = 0.047$), even when adjusting for covariates. In addition, supplementary table 2 shows another model of logistic regression including myocardial infarction, arterial coronary disease, and education level, which indicated a significant association of AG or GG genotypes with success rate.

Discussion

Our main findings corroborate King et al.'s study [20], which discovered the association of the G allele for rs8109525 polymorphism with smoking cessation. We also observed greater success rates in patients with AG and GG genotypes, who were only treated with varenicline and were followed up for 6 months.

The rs8109525 is a polymorphism located in the intronic region of the *CYP2B6* gene, which is responsible for the coding of the isoenzyme of the same name. In previous studies, this polymorphism showed strong linkage disequilibrium with missense-type *CYP2B6*5* and *6 polymorphisms, which are predictors of slow metabolism of nicotine and could be, at least in part, responsible for the finding [24, 25]. The CYP2B6 isoenzyme plays an important role in nicotine metabolism, although it is not the main metabolizing isoenzyme [24, 25]. CYP2A6-mediated metabolizes nicotine in cotinine, which is then metabolized to 3′-hydroxycotinine (3HC). This process represents 70–80% of nicotine metabolism. A study, using human liver samples, indicated that the presence of the variant rs8109525 was associated with lower expression of *CYP2B6* mRNA [25].

An experimental study with rats selectively inhibited cerebral CYP2B, which mimics the genetically slow metabolism of CYP2B6 in humans, and it found high levels of nicotine in the brain (but not in the plasma). In addition, they observed a greater number of treatment sessions required to extinguish

Table 3 Analysis of multiple logistic regression for success of smoking cessation in patients submitted to varenicline treatment ($n = 167$) for *CYP2B6* rs8109525

Variables	OR	CI95%	*P* value
Genotypes AG or GG	2.01	1.01–4.00	0.047
Gender (male)	1.50	0.76–2.97	0.244
Age	0.99	0.97–1.03	0.947
Self-declared race/color (white)	1.21	0.43–3.46	0.720
FTND score	0.94	0.83–1.06	0.311

FTND, Fagerström test for nicotine dependence

the self-administration of nicotine, suggesting a role of CYP2B6 in the brain [26]. In contrast, a recent study failed to demonstrate CYP2B6 activity in human brain tissue using either ketamine or methadone as CYP2B6 substrates [27].

Recent studies have shown that normal nicotine metabolizers have higher dopaminergic reward circuit reactivity than slow metabolizers [28]. In the same sense, Sofuoglu et al. [29] showed that normal metabolizers have higher oscillations of nicotine concentration in the blood (and probably in the brain) than slow metabolizers. Thus, the variation of nicotine concentration could explain the greater exacerbation of the reward circuit, promoting more intense withdrawal symptoms. Consequently, lower brain fluctuations of nicotine concentration in slow metabolizers could facilitate smoking cessation in response to smoking cessation treatment [29–32].

Our hypothesis for explaining the greater success in treatment with varenicline in individuals carrying the G allele for rs8109525 includes the following data: lower gene expression of the CYP2B6 isoenzyme, possible linkage disequilibrium with predictive polymorphisms of slow metabolizers, and less oscillating concentrations of nicotine in slow metabolizers.

This study has some limitations. Firstly, the patients from the PAF present some peculiarities: they have a high Fagerström score, they come from a tertiary hospital, and most have comorbidities. Secondly, in this protocol, we did not perform the measurement of nicotine metabolites to evaluate the metabolic phenotype. Thirdly, statistical power was limited for the associations with *CYP2A6* polymorphisms due to low frequencies of its risk alleles. Finally, we were not fully able to exclude the impact of variables on the applied model to associate genotypes with success rate; however, even with adjusted models for covariates such as FTND, education level, arterial coronary disease, and acute myocardial infarction, we observed significant findings.

Conclusion

CYP2B6 rs8109525 was associated with higher success rates of smoking cessation with varenicline treatment. This finding may be useful in pharmacogenomic strategies for smoking cessation therapy.

Acknowledgments We thank the patients who participated in the study and the technical assistance of the Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology group.

Authorship and author responsibilities PRXT, MK, JRS, and PCJLS carried out the molecular genetic and statistical analysis and drafted the manuscript. PCJLS, JS, TOA, PVG, JEK, and ACP participated in the design of the study and ceded the facilities. JS, TOA, and PVG selected the patients. All authors contributed critically to the manuscript, whose present version was read and approved by all.

Funding disclosure We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil)—Proc. 2013/09295-3 and CNPq (Proc. 470410/2013-2), Brazil. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001 (PRX Tomaz and JR Santos are recipients of fellowships from CAPES, Brazil). Sociedade Hospital Samaritano—Ministério da Saúde (PROADI-SUS; SIPAR: 25000.180.672/2011-81).

Compliance with ethical standards

Written informed consent was obtained from all participants prior to entering the study (CAPPESQ no. 0022/11—SDC: 3579/10/168).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. ORGANIZATION WH (2015) WHO Report on the global tobacco epidemic, 2015. Raising taxes on tobacco
2. Ribeiro SA, Jardim JR, Laranjeira RR, Alves AK, Kesselring F, Fleissig L, Almeida MZ, Matsuda M, Hamamoto RS (1999) Smoking prevalence at the Federal University of São Paulo, 1996–preliminary data of an institutional program. Rev Assoc Med Bras (1992) 45:39–44
3. 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 (2007) Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. Hum Mol Genet 16:36–49
4. Sarginson JE, Killen JD, Lazzeroni LC, Fortmann SP, Ryan HS, Schatzberg AF, Murphy GM (2011;156B) 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 156:275–284
5. Marinho IM, Carmona MJC, Benseñor FEM, Hertel JM, Moraes MFB, Santos PCJL, Vane MF, Issa JS (2018) Surgery is unlikely to be enough for a patient to stop smoking 24h prior to hospital admission. Rev Bras Anestesiol 68:344–350
6. Henningfield JE, Slade J (1998) Tobacco-dependence medications: public health and regulatory issues. Food Drug Law J 53(suppl): 75–114
7. Laviolette SR, van der Kooy D (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. Nat Rev Neurosci 5:55–65
8. Fiore MCB, Cohen SJ, Dorfman SF, Goldstein MG, Gritz ER et al (2000) Treating tobacco use and dependence. In: Clinical Practice Guideline
9. Fiore MCJ, Baker TB, Bailey WC, Benowitz NL, Curry SJ et al (2008) Treating tobacco use and dependence: 2008 update. In: Clinical Practice Guideline
10. Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI (2000) Bupropion is a nicotinic antagonist. J Pharmacol Exp Ther 295:321–327
11. Sieminska A, Jassem E, Kita-Milczarska K (2015) Nicotine dependence in an isolated population of Kashubians from North Poland: a population survey. BMC Public Health 15:80
12. Ho MK, Tyndale RF (2007) Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking. Pharmacogenomics J 7:81–98
13. Silva AP, Scholz J, Abe TO, Pinheiro GG, Gaya PV, Pereira AC, Santos PC (2016) Influence of smoking cessation drugs on blood pressure and heart rate in patients with cardiovascular disease or high risk score: real life setting. BMC Cardiovasc Disord 16:2

14. Scholz J, Santos PC, Buzo CG, Lopes NH, Abe TO, Gaya PV, Pierri H, Amorim C, Pereira AC (2016) Effects of aging on the effectiveness of smoking cessation medication. Oncotarget. 7: 30032–30036
15. Hiroi N, Scott D (2009) Constitutional mechanisms of vulnerability and resilience to nicotine dependence. Mol Psychiatry 14:653–667
16. Volkow ND (2005) What do we know about drug addiction? Am J Psychiatry 162:1401–1402
17. Tomaz PR, Santos JR, Issa JS, Abe TO, Gaya PV, Krieger JE, Pereira AC, Santos PC (2015) CYP2B6 rs2279343 polymorphism is associated with smoking cessation success in bupropion therapy. Eur J Clin Pharmacol 71:1067–1073
18. Chatkin JM (2006) The influence of genetics on nicotine dependence and the role of pharmacogenetics in treating the smoking habit. J Bras Pneumol 32:573–579
19. Bibi Z (2008) Role of cytochrome P450 in drug interactions. Nutr Metab (Lond) 5:27
20. King DP, Paciga S, Pickering E, Benowitz NL, Bierut LJ, Conti DV, Kaprio J, Lerman C, Park PW (2012) Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion in placebo-controlled clinical trials. Neuropsychopharmacology 37:641–650
21. Tomaz PRX, Santos JR, Scholz J, Abe TO, Gaya PV, Negrão AB, Krieger JE, Pereira AC, Santos PCJL (2018) Cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit polymorphisms are associated with smoking cessation success in women. BMC Med Genet 19:55
22. Pérez-Rubio G, López-Flores LA, Ramírez-Venegas A, Noé-Díaz V, García-Gómez L, Ambrocio-Ortiz E, Sánchez-Romero C, Hernández-Zenteno RJ, Sansores RH, Falfán-Valencia R (2017) Genetic polymorphisms in CYP2A6 are associated with a risk of cigarette smoking and predispose to smoking at younger ages. Gene. 628:205–210
23. López-Flores LA, Pérez-Rubio G, Ramírez-Venegas A, Ambrocio-Ortiz E, Sansores RH, Falfán-Valencia R (2017) Data on polymorphisms in CYP2A6 associated to risk and predispose to smoking related variables. Data Brief 15:86–91
24. Allenby CE, Boylan KA, Lerman C, Falcone M (2016) Precision medicine for tobacco dependence: development and validation of the nicotine metabolite ratio. J NeuroImmune Pharmacol 11:471–483
25. Bloom AJ, Martinez M, Chen LS, Bierut LJ, Murphy SE, Goate A (2013) CYP2B6 non-coding variation associated with smoking cessation is also associated with differences in allelic expression, splicing, and nicotine metabolism independent of common amino-acid changes. PLoS One 8:e79700
26. Chenoweth MJ, Tyndale RF (2017) Pharmacogenetic optimization of smoking cessation treatment. Trends Pharmacol Sci 38:55–66
27. Bloom AJ, Wang PF, Kharasch ED (2019) Nicotine oxidation by genetic variants of CYP2B6 and in human brain microsomes. Pharmacol Res Perspect 7:e00468
28. Tang DW, Hello B, Mroziewicz M, Fellows LK, Tyndale RF, Dagher A (2012) Genetic variation in CYP2A6 predicts neural reactivity to smoking cues as measured using fMRI. Neuroimage. 60:2136–2143
29. Sofuoglu M, Herman AI, Nadim H, Jatlow P (2012) Rapid nicotine clearance is associated with greater reward and heart rate increases from intravenous nicotine. Neuropsychopharmacology. 37:1509–1516
30. Lerman C, Schnoll RA, Hawk LW, Cinciripini P, George TP, Wileyto EP, Swan GE, Benowitz NL, Heitjan DF, Tyndale RF, Group P-PR (2015) Use of the nicotine metabolite ratio as a genetically informed biomarker of response to nicotine patch or varenicline for smoking cessation: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. Lancet Respir Med 3:131–138
31. Issa JS, Abe T, Moura S, Santos PC, Pereira AC (2013) Effectiveness of coadministration of varenicline, bupropion, and serotonin reuptake inhibitors in a smoking cessation program in the real-life setting. Nicotine Tob Res 15:1146–1150
32. Issa JS, Santos PC, Vieira LP, Abe TO, Kupersztmidt CS, Nakasato M, Cardoso E, Amorim C, Pereira AC (2014) Smoking cessation and weight gain in patients with cardiovascular disease or risk factor. Int J Cardiol 172:485–487

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ANEXO E – Artigo submetido na *Frontiers in Pharmacology*, sessão *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics* (2022).

Evaluation of the nicotine metabolite ratio in smoking patients treated with varenicline and bupropion

Paulo Roberto Xavier Tomaz[1], Thuane Sales Gonçalves[2], Juliana Rocha Santos[1], Jaqueline Scholz[3], Tânia Ogawa Abe[3], Patrícia Viviane Gaya[3], Eduardo Figueiredo[4], Henrique Dipe de Faria[4], Isarita Martins[4], Ana Miguel Fonseca Pego[5], Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos[6], Maurício Yonamine[6], Alexandre Costa Pereira[1], Paulo Caleb Júnior Lima Santos[2*]

[1]Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Instituto do Coracão (InCor), Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
[2] Department of Pharmacology – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo EPM-Unifesp, São Paulo, Brazil.
[3] Smoking Cessation Program Department, Instituto do Coracão (InCor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
[4] Unifal – MG.
[5] John Jay College of Criminal Justice, City University of New York, New York, United States.
[6] Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*** Correspondence:**
Paulo Caleb Junior Lima Santos
paulo.caleb@unifesp.br

Keywords: **Nicotine metabolite ratio; Varenicline; Bupropion; Smoking cessation; Trans-3'-hydroxycotinine, Cotinine.**

Abstract

Background: Smoking is the leading cause of preventable death worldwide. It is responsible for several types of cancer, cardiovascular diseases, and diseases of the reproductive system, among others. Therefore, advances in research are increasingly necessary in order to make anti-smoking treatment more assertive. Some studies have investigated the association of the nicotine metabolite ratio (NMR) with general characteristics and treatment outcomes. In the present study, the main aim was to evaluate the NMR in smoking patients from an Assistance Program of a tertiary cardiology hospital. **Methodology:** Serum samples were collected from 185 patients at T0 (while patients were still smoking and before starting pharmacological treatment). Cotinine and hydroxycotinine analytes were measured using liquid-chromatography tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS). By looking at the relationship between hydroxycotinine and cotinine, we can obtain the NMR, with which it is possible to classify patients into slow metabolizers (NMR < 0.31), as well as normal or rapid metabolizers (NMR ≥ 0.31). **Results:** From a total of 185 patients, 55 were considered slow metabolizers and 130 as normal/fast. The metabolite averages were associated with the number of cigarettes smoked per day ($p < 0.001$ for cotinine and 0.023 hydroxycotinine). However, we were unable to analyze the association of the NMR with general and clinical characteristics of patients under anti-smoking treatment. **Conclusion:** We were able to evaluate the NMR, and to observe categories of metabolizers in Brazilian patients under pharmacological treatments. Thus, this study can contribute to the indication

of a form of analysis, which might form part of the customization of anti-smoking treatments and, consequently, improve the success rates in the smoking cessation process.

1 Introduction

Nicotine is metabolized mainly by cytochrome p450 (CYP) 2A6, and to a lesser extent by enzymes CYP2B6, CYP2D6 and CYP2E1 (Allenby et al., 2016; Messina et al., 1997). Through a CYP2A6-mediated metabolism, cotinine (CO) is the primary metabolite of nicotine, which is still metabolized in 3'-hydroxycotinine (3HC). This pathway represents 70-80% of nicotine metabolism, where cotinine metabolites represent the majority of urinary metabolites (Allenby et al., 2016). Cotinine's half-life is approximately 13 to 19 hours, which is much longer than the half-life nicotine (1-2 hours) or 3HC (approximately 5 hours) (Allenby et al., 2016; Mamoun et al., 2015). Because CO has a long half-life, its concentrations in the blood and urine of smokers are relatively stable throughout the day. However, they are still somewhat dependent on time of the last cigarette (Allenby et al., 2016; Benowitz & Jacob, 2001). Thus, 3HC concentrations depend on CO metabolism, which is mediated by CYP2A6 49. The ratio of 3HC to CO is a stable measure of activity of CYP2A6 and this does not depend on the time of the last nicotine intake.

Nicotine Metabolite Ratio (NMR) is a validated biomarker of nicotine metabolism. It is calculated using the 3HC/CO ratio. Studies indicate that higher rates are associated with greater nicotine metabolism (≥ 0.31) and longer abstinence with non-nicotinic drugs, while lower rates indicate less nicotine metabolism (< 0.31), allowing for longer abstinence in anti-smoking treatment with nicotinic repositories (Allenby et al., 2016; Lerman et al., 2006; Schnoll et al., 2009). NMR can be reliably measured in saliva, plasma or serum, has minimal daytime variation, and does not depend on the time that the last cigarette was smoked for those individuals who smoke more than 5 cigarettes a day (Allenby et al., 2016; Dempsey et al., 2004).

Recent studies have shown associations between NMR and response to pharmacological treatment for tobacco dependence and smoking cessation (Ho et al., 2009; Lerman et al., 2006; Schnoll et al., 2009), which nowadays include varenicline (a partial agonist of nAChR), bupropion (a norepinephrine reuptake inhibitor, and dopamine and nicotinic antagonist) and nicotine replacement therapy (Fiore et al., 2008; Slemmer et al., 2000).

Due to the evidence that NMR can be a useful tool in personalizing treatment for smoking cessation, the present article aimed to quantify the NMR in smokers treated with varenicline and/or bupropion from an assistance program of a tertiary cardiology hospital. It also sought to evaluate possible associations between the nicotine metabolic profile and the outcomes of the pharmacological treatment.

2 Methods

2.1 Study population

For this study, 185 patients of both genders, aged ≥ 18, participating in the Smoker Assistance Program of the Instituto do Coração from Hospital das Clínicas/University of São Paulo (HC/FMUSP), were included through the protocol of research, approved by the Institutional Ethics Committee (CAAE: 60133816.0.0000.0068).

2.2 Nicotine Metabolite Ratio (NMR)

The serum samples of participants were collected at time 0 (T0), i.e. before starting pharmacological treatment, while the patient was still smoking. From the sample collected at T0, it was possible to quantify the NMR, using liquid-chromatography tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS) instrumentation, and use those results to classify patients into slow metabolizers (NMR < 0.31 ng/mL) and normal or rapid metabolizers (NMR ≥ 0.31 ng/mL) (Allenby et al., 2016). Subsequently, the treatment outcome was evaluated at time 4 (T4) and 12 (T12), 4 and 12 weeks after the beginning of pharmacological treatment, respectively. Patients who had stopped smoking at the evaluated times were considered successful. If patients who started treatment with varenicline in monotherapy were considered resistant at T4, they had bupropion as an adjuvant drug.

Analyses were performed on a Waters (Milford, USA) Acquity UPLC liquid chromatography system coupled to a Micromass Quattro Premier XE mass spectrometer (Wilmslow, UK). Chromatographic separation was achieved using an Acquicty UPLC BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm), also purchased from Waters (Milford, USA). Sample extraction consisted of a very simple and straightforward protein precipitation using a cold mixture of ACN/MeOH (80:20/v:v). For this, multi-tube vortex equipment, model VX-2500, from VWR (Thorofare, USA) was used, as well as a centrifuge, model 5702, from Eppendorf (Berzdorf, Germany).

The Microsoft Excel® 2011 program was used to process the data obtained by exporting raw data.

2.3 Statistical analysis

Regarding general characteristics, continuous variables (age in years and number of cigarettes per day) were presented as mean and standard deviation, and categorical variables (gender and self-declared race/color) as frequencies.

The chi-square test was performed for a comparative analysis of general categorical variables with the metabolism profile, and frequency of slow metabolizers according to the pharmacological treatment and its outcomes. Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov tests were performed to verify the normality of continuous variables. General characteristics were in accordance with the metabolization profile, and NMR values and metabolites concentration were in accordance with the pharmacological treatment and its outcomes. The Mann–Whitney hypothesis test was used for NMR values and metabolite concentration, as these variables are not normally distributed and therefore were presented as median and interquartile range between 25% and 75%. Spearman's correlation test was performed to assess the association of metabolite concentrations with the number of cigarettes per day.

All statistical analysis was performed using SPSS software (version 20, IBM Corp, Armonk, New York, USA), considering a significance level of $P < 0.05$.

3 Results

3.1 General characteristics and NMR

From the 185 patients evaluated, 130 (70.3%) were classified as normal or fast metabolizers, and 55 (29.7%) as slow metabolizers according to the NMR. The mean age was 51±11 years, 113 (61,1%) being female and 145 (78,4%) self-declared white. The average number of cigarettes per day was 20±9. Table 1 shows the comparison of age, gender, self-declared race/color and number of cigarettes per day according to NMR categories. There were no significant differences between the general characteristics and normal/fast and slow metabolizers.

The Sperman correlation test showed that there is a positive correlation between the number of cigarettes smoked per day and the concentration of CO ($r = 0.30$; $p < 0.001$) and 3HC ($r = 0.17$; $p = 0.02$) before starting the treatment (T0).

3.2 Nicotine metabolite concentration and treatment outcomes

The concentration of nicotine metabolites - CO and 3HC - measured at T0, was presented as median (25% and 75% percentiles). Such concentrations are available in Table 2 according to the results of treatment for smoking cessation, evaluated at 4 and 12 weeks after the start of pharmacological treatment. The NMR values were also presented as median (25% and 75% percentiles). For this calculation, hydroxycotinine was considered as trans-3-hydroxycotinine, since the amount of other isomers was irrelevant.

From the 164 patients evaluated at T4, only 59 (36%) achieved therapeutic success with anti-smoking pharmacological treatment. Of the 105 (64%) patients who were not successful, and therefore were considered resistant, 30 (28.6%) were slow metabolizers, according to the NMR classification performed at T0. From the 162 patients evaluated at T12, 101 (62.4%) achieved therapeutic success with anti-smoking pharmacological treatment. Of the 61 (37.6%) patients considered resistant, 17 (27.9%) were slow metabolizers, according to the NMR classification performed at T0. No significant differences were identified between the groups evaluated.

Supplementary Table 1 also shows the median nicotine metabolite concentrations (25% and 75% percentiles) that were collected at T0 according to the outcome of treatment with the drugs varenicline, bupropion, and varenicline plus bupropion. None of the metabolites showed a significant difference between the drugs and associated outcomes.

4 Discussion

Tobacco use is still a global public health issue and continues to represent the largest cause of preventable death, accounting for nearly 30% of cancer-related mortality in the USA (Lortet-Tieulent et al., 2016). Nowadays, approved smoking cessation drugs such as bupropion and varenicline have a success rate of about one third of patients (Cahill et al., 2013; Hartmann-Boyce et al., 2014; Kotz et al., 2014), while nicotine replacement therapy presents rates of 20 to 25% (Stead et al., 2012). In this context, where only about a third of patients are successful with treatment, the use of strategies that allow individualized treatment, such as those that consider genetic and/or individual factors, may be able to increase success rates (King et al., 2012).

NMR has been validated as a tool to select the optimal treatment for smokers to ensure the best possible outcomes (Siegel et al., 2020), as the 3HC/CO ratio is expected to reflect CYP2A6 activity. Therefore, it is possible to infer that the greater the activity of CYP2A6, the greater the nicotine intake to maintain the desired levels of the substance in the body, which, consequently, would lead to the need to smoke more cigarettes (Allenby et al., 2016).

The relationship between NMR and response to pharmacological treatment of smoking may be mediated by variability in the neurobiological reward of nicotine. Fast nicotine metabolizers have greater availability of nicotinic receptors, which leads to increased brain activity in response to smoking and greater subjective reward. These patients exhibit more signs and symptoms of nicotine dependence and titrate their nicotine dose by smoking more cigarettes per day (Siegel et al., 2020). Our analysis was unable to identify differences between slow and fast or normal metabolizers in terms of

the number of cigarettes smoked per day - an average of 20 cigarettes was identified in both groups. However, a positive correlation between the number of cigarettes smoked per day and the concentration of CO and 3HC was found. This data corroborates studies that show greater confidence in NMR measurements from plasma samples (Tanner et al., 2015).

In our study, 29.7% of patients were classified as slow metabolizers according to the NMR and no significant differences were found between NMR and general characteristics. Some studies have also failed to demonstrate significant associations between NMR and gender, age or race (St.Helen et al., 2019; Verplaetse et al., 2020; Vogel et al., 2021). On the other hand, there is evidence that higher NMR was associated with female gender, white race, number of cigarettes per day and measures of nicotine dependence (Chen et al., 2018).

Regarding the response to pharmacological treatment, studies have shown that bupropion significantly increased dropout rates among fast nicotine metabolizers, but did not provide any additional benefit to slow metabolizers (Patterson et al., 2008). Although it was not possible to detect significant differences, our study found that only 14.3% of slow metabolizers treated with bupropion achieved success after 12 weeks of treatment. This was the lowest success rate among slow metabolizers found in our analysis. Other studies have also shown a higher success rate among fast metabolizers when treated with varenicline, suggesting that nicotine replacement therapies are the most appropriate treatment for slow metabolizers (Glatard et al., 2017; Lerman et al., 2015).

There is a substantial variation in the response to pharmacological treatment for smoking cessation. Evidence suggests that individual and environmental factors may contribute to these differences. NMR has proved to be a useful tool that contributes to better pharmacological responses. Unfortunately, due to the sample size, we were not able to demonstrate significant associations between NMR and general characteristics or the outcome of pharmacological treatment - this being the main limitation of our study. Nevertheless, we believe that the use of NMR shows great potential and can have a synergistic effect on smoking cessation, along with new behavioral approaches to adherence enhancement and pharmacogenetic tools, and should be the focus of future research in this area.

5 Conclusion

We were able to evaluate NMR, and to observe categories of metabolizers, in Brazilian patients under pharmacological treatments. Thus, this study can contribute to the indication of a form of analysis, which might form part of the customization of anti-smoking treatments and, consequently, improve success rates in the smoking cessation process.

6 Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

7 Author Contributions

PRXT, TSG, JRS and PCJLS carried out the molecular genetic and statistical analysis, and drafted the manuscript. PCJLS, ACP, HD, ECF, IM, AP and MY participated in the design of the study, drug and metabolite evaluations, and ceded the facilities. JS, TOA and PVG selected the patients. All authors contributed critically to the manuscript, whose present version was read and approved by all.

8 Funding

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) – Proc. 2019/08338-7 and CNPq (Proc. 470410/2013-2), Brazil. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 (PRXT, TSG and JRS are recipients of fellowships from CAPES, Brazil).

9 Acknowledgments

We thank the patients who participated in the study, the technical assistance of the participating laboratories, Sociedade Hospital Samaritano, and FAPESP, CAPES and CNPq for financial support.

10 Reference list

Allenby, C. E., Boylan, K. A., Lerman, C., & Falcone, M. (2016). Precision Medicine for Tobacco Dependence: Development and Validation of the Nicotine Metabolite Ratio. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 471–486. https://doi.org/10.1007/s11481-016-9656-y

Benowitz, N. L., & Jacob, P. (2001). *Trans-3k-hydroxycotinine: Disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking*.

Cahill, K., Stevens, S., Perera, R., & Lancaster, T. (2013). Pharmacological interventions for smoking cessation: An overview and network meta-analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2013*(5). https://doi.org/10.1002/14651858.CD009329.PUB2/MEDIA/CDSR/CD009329/IMAGE_N/NCD009329-AFIG-FIG04.PNG

Chen, A., Krebs, N. M., Zhu, J., & Muscat, J. E. (2018). Nicotine metabolite ratio predicts smoking topography: The Pennsylvania Adult Smoking Study. *Drug and Alcohol Dependence*, *190*, 89–93. https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2018.06.003

Dempsey, D., Tutka, P., Jacob, P., Allen, F., Schoedel, K., Tyndale, R. F., & Benowitz, N. L. (2004). Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *76*(1), 64–72. https://doi.org/10.1016/J.CLPT.2004.02.011

Fiore, M., Jaén, C. R., Baker, T. B., Bailey, W., Bennett, G., Benowitz, N. L., Christiansen, B. A., Connell, M., Curry, S. J., Dorfman, S. F., Heishman, S., Henderson, P. N., Goldstein, M. G., Hasselblad, V., Healton, C. G., Kottke, T. E., Lando, H. A., Leitzke, C., Mecklenburg, R. E., … Williams, C. (2008). *A Clinical Practice Guideline for Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update: A U.S. Public Health Service Report The Clinical Practice Guideline Treating Tobacco Use and Dependence 2008 Update Panel, Liaisons, and Staff*. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.04.009

Glatard, A., Dobrinas, M., Gholamrezaee, M., Lubomirov, R., Cornuz, J., Csajka, C., & Eap, C. B. (2017). Association of nicotine metabolism and sex with relapse following varenicline and nicotine replacement therapy. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *25*(5), 353–362. https://doi.org/10.1037/PHA0000141

236 Hartmann-Boyce, J., Stead, L. F., Cahill, K., & Lancaster, T. (2014). Efficacy of interventions to
237 combat tobacco addiction: Cochrane update of 2013 reviews. *Addiction*, *109*(9), 1414–1425.
238 https://doi.org/10.1111/ADD.12633

239 Ho, M. K., Mwenifumbo, J. C., al Koudsi, N., Okuyemi, K. S., Ahluwalia, J. S., Benowitz, N. L., &
240 Tyndale, R. F. (2009). Association of nicotine metabolite ratio and CYP2A6 genotype with smoking
241 cessation treatment in African-American light smokers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*,
242 *85*(6), 635–643. https://doi.org/10.1038/CLPT.2009.19

243 King, D. P., Paciga, S., Pickering, E., Benowitz, N. L., Bierut, L. J., Conti, D. v., Kaprio, J., Lerman,
244 C., & Park, P. W. (2012). Smoking cessation pharmacogenetics: analysis of varenicline and bupropion
245 in placebo-controlled clinical trials. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American*
246 *College of Neuropsychopharmacology*, *37*(3), 641–650. https://doi.org/10.1038/NPP.2011.232

247 Kotz, D., Brown, J., & West, R. (2014). 'Real-world' effectiveness of smoking cessation treatments:
248 a population study. *Addiction*, *109*(3), 491–499. https://doi.org/10.1111/ADD.12429

249 Lerman, C., Schnoll, R. A., Hawk, L. W., Cinciripini, P., George, T. P., Wileyto, E. P., Swan, G. E.,
250 Benowitz, N. L., Heitjan, D. F., & Tyndale, R. F. (2015). Use of the nicotine metabolite ratio as a
251 genetically informed biomarker of response to nicotine patch or varenicline for smoking cessation: a
252 randomised, double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, *3*(2), 131–138.
253 https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70294-2

254 Lerman, C., Tyndale, R., Patterson, F., Wileyto, E. P., Shields, P. G., Pinto, A., & Benowitz, N. (2006).
255 Nicotine metabolite ratio predicts efficacy of transdermal nicotine for smoking cessation. *Clinical*
256 *Pharmacology and Therapeutics*, *79*(6), 600–608. https://doi.org/10.1016/J.CLPT.2006.02.006

257 Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Lin, C. C., Coebergh, J. W. W., & Jemal, A. (2016). U.S. Burden
258 of Cancer by Race and Ethnicity According to Disability-Adjusted Life Years. *American Journal of*
259 *Preventive Medicine*, *51*(5), 673–681. https://doi.org/10.1016/J.AMEPRE.2016.07.039

260 Mamoun, M., Bergen, A. W., Shieh, J., Wiggins, A., & Brody, A. L. (2015). Biomarkers of Response
261 to Smoking Cessation Pharmacotherapies: Progress to Date. *CNS Drugs*.
262 https://doi.org/10.1007/s40263-015-0243-1

263 Messina, E. S., Tyndale, R. F., & Sellers, E. M. (1997). A Major Role for CYP2A6 in Nicotine C-
264 Oxidation by Human Liver Microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,
265 *282*(3).

266 Patterson, F., Schnoll, R. A., Wileyto, E. P., Pinto, A., Epstein, L. H., Shields, P. G., Hawk, L. W.,
267 Tyndale, R. F., Benowitz, N., & Lerman, C. (2008). Toward Personalized Therapy for Smoking
268 Cessation: A Randomized Placebo-controlled Trial of Bupropion. *Clinical Pharmacology &*
269 *Therapeutics*, *84*(3), 320–325. https://doi.org/10.1038/CLPT.2008.57

270 Schnoll, R. A., Patterson, F., Wileyto, E. P., Tyndale, R. F., Benowitz, N., & Lerman, C. (2009).
271 Nicotine metabolic rate predicts successful smoking cessation with transdermal nicotine: a validation
272 study. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *92*(1), 6–11.
273 https://doi.org/10.1016/J.PBB.2008.10.016

274 Siegel, S. D., Lerman, C., Flitter, A., & Schnoll, R. A. (2020). The Use of the Nicotine Metabolite
275 Ratio as a Biomarker to Personalize Smoking Cessation Treatment: Current Evidence and Future
276 DirectionsPersonalized Treatment for Smoking. *Cancer Prevention Research*, *13*(3), 261–272.
277 https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0259

278 Slemmer, J. E., Martin, B. R., & Damaj, M. I. (2000). Bupropion Is a Nicotinic Antagonist. *Journal of*
279 *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *295*(1).

280 Stead, L. F., Perera, R., Bullen, C., Mant, D., Hartmann-Boyce, J., Cahill, K., & Lancaster, T. (2012).
281 Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*,
282 *2017*(12). https://doi.org/10.1002/14651858.CD000146.PUB4/INFORMATION/EN

283 St.Helen, G., Benowitz, N. L., Ahluwalia, J. S., Tyndale, R. F., Addo, N., Gregorich, S. E., Pérez-
284 Stable, E. J., & Cox, L. S. (2019). Black Light Smokers: How Nicotine Intake and Carcinogen
285 Exposure Differ Across Various Biobehavioral Factors. *Journal of the National Medical Association*,
286 *111*(5), 509–520. https://doi.org/10.1016/J.JNMA.2019.04.004

287 Tanner, J. A., Novalen, M., Jatlow, P., Huestis, M. A., Murphy, S. E., Kaprio, J., Kankaanpää, A.,
288 Galanti, L., Stefan, C., George, T. P., Benowitz, N. L., Lerman, C., & Tyndale, R. F. (2015). Nicotine
289 metabolite ratio (3-Hydroxycotinine/Cotinine) in plasma and urine by different analytical methods and
290 laboratories: Implications for clinical implementation. *Cancer Epidemiology Biomarkers and*
291 *Prevention*, *24*(8), 1239–1246. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-
292 1381/68081/AM/NICOTINE-METABOLITE-RATIO-3-HYDROXYCOTININE

293 Verplaetse, T. L., Peltier, M. R., Roberts, W., Moore, K. E., Pittman, B. P., & McKee, S. A. (2020).
294 Associations Between Nicotine Metabolite Ratio and Gender With Transitions in Cigarette Smoking
295 Status and E-Cigarette Use: Findings Across Waves 1 and 2 of the Population Assessment of Tobacco
296 and Health (PATH) Study. *Nicotine & Tobacco Research*, *22*(8), 1316–1321.
297 https://doi.org/10.1093/NTR/NTAA022

298 Vogel, E. A., Benowitz, N. L., Skan, J., Schnellbaecher, M., & Prochaska, J. J. (2021). Correlates of
299 the nicotine metabolite ratio in Alaska Native people who smoke cigarettes. *Experimental and Clinical*
300 *Psychopharmacology*. https://doi.org/10.1037/PHA0000461

301

302 **Table 1: General characteristics of the total group of patients, according to NMR.**

	Normal and fast metabolizers* (n = 130)	Slow metabolizers** (n = 55)	P-value
Age (years)	52 ± 11	50 ± 12	0.32
Gender, female (%)	58.5	67.3	0.26
Self-declared race/color, white (%)	80.0	74.5	0.41
Number of cigarettes per day	20 ± 9	20 ± 8	0.97

303 NMR: Nicotinic Metabolite Ratio. *Normal and fast metabolizers = NMR ≥0.31. ** Slow metabolizers = NMR <0.31.

304

305 **Table 2: Concentration of analytes according to outcome in patients treated with drugs for**
306 **smoking cessation.**

	Resistant T4** (n = 105)	Success T4** (n = 59)	P-value	Resistant T12** (n = 61)	Success T12** (n = 101)	P-value
Cotinine (µg/L)* **	74.60 (47.75 - 118.53)	59.20 (43.00 - 92.10)	0.08	75.00 (53.85 - 120.79)	65.40 (42.45 - 107.85)	0.11
Hydroxycotinine (µg/L)* **	60.80 (5.80 - 101.77)	37.40 (9.60 - 66.50)	0.07	56.25 (9.75 - 103.55)	44.60 (6.95 - 87.00)	0.42
NMR	0.69 (0.09 - 1.15)	0.60 (0.14 - 0.93)	0.33	0.65 (0.23 - 0.96)	0.64 (0.10 - 1.09)	0.80
Slow metabolizer (%)*	28.6	30.5	0.79	27.9	30.7	0.70

307 T4: Visit 4 weeks after pharmacological treatment; T12: Visit 12 weeks after pharmacological treatment; NMR: Nicotinic
308 metabolite ratio. *Slow metabolizer (NMR <0.31). **T4 outcome (n = 164), T12 outcome (n = 162). *** Concentrations
309 of metabolites from serum samples collected before the start of treatment (T0).