



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NATALIA DE CARVALHO FARIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA SALIVA DE USUÁRIOS DE CIGARRO
ELETRÔNICO**

2024

NATALIA DE CARVALHO FARIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA SALIVA DE USUÁRIOS DE CIGARRO
ELETRÔNICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação, reparação tecidual e patologia do sistema estomatognático.

Orientadora: Profa. Dra. Janete Dias Almeida

Coorientador: Prof. Dr. André Zelanis Palitot Pereira

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Faria, Natalia de Carvalho

Análise proteômica da saliva de usuários de cigarro eletrônico. / Natalia de Carvalho Faria. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientadora: Janete Dias Almeida

Coorientador: André Zelanis Palitot Pereira

1. Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina. 2. Saliva. 3. Proteoma. 4. Espectrometria de Massas. 5. Cotinina. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Pereira, André Zelanis Palitot, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Estudar os efeitos do uso de cigarros eletrônicos na saúde de seus usuários, com foco nas implicações nas funções salivares, torna-se crucial em um contexto contemporâneo onde o emprego desses dispositivos está em constante ascensão. Além disso, a identificação e avaliação das proteínas possivelmente vinculadas a alterações biológicas em uma amostra significativa de usuários de cigarro eletrônico, como abordado nesta pesquisa, são de suma importância para a conscientização sobre os potenciais riscos à saúde da população.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Studying the effects of using electronic cigarettes on the health of their users, focusing on the implications on salivary functions, becomes crucial in a contemporary context where the use of these devices is constantly rising. Moreover, the identification and evaluation of proteins possibly linked to biological changes in a significant sample of electronic cigarette users, as addressed in this research, are of utmost importance for raising awareness about the potential health risks to the population.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Maria Anita Mendes

Universidade de São Paulo - USP
Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
Campus de São Paulo

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 04 de março de 2024.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Flavia,

Não existem palavras para descrever a gratidão por ter seu apoio e amor incondicional nessa vida. Quando eu não acreditei, você nunca me deixou desistir.
Você é meu maior exemplo.

Ao meu pai Cleber,

Mesmo nas dificuldades, você sempre esteve presente por toda nossa família.
Alguém que sempre batalhou para que nossos sonhos se realizassem.
Você também é meu maior exemplo.

À minha irmã Manuela,

Tenho certeza que seu caminho será repleto de muitas realizações e alegrias.
Obrigada por dividir todos os momentos comigo.

Aos meus avós Amado, José Carlos, Nelita e minha tia Camila (*in memorian*),

Sei que aonde estiverem estão torcendo e felizes por mim.
Se hoje cheguei aqui foi porque estiveram ao meu lado durante o caminho.
Levo vocês comigo sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço novamente a minha família por todo o amor, apoio, carinho e por terem permitido que esse sonho se realizasse. Não há palavras para expressar o quanto sou grata por ter vocês ao meu lado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Cesar Rogério Pucci e da vice-diretora Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde Bucal, na pessoa do coordenador Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges e da vice Profa. Tit. Juliana Campos Junqueira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Auxílio Pesquisa durante o período de realização desse trabalho.

À minha orientadora, professora Janete Dias Almeida, por todo auxílio e atenção. Suas palavras, conselhos e amizade foram muito importantes, um verdadeiro porto seguro para minha alma ansiosa. Guardo com muito carinho todos os ensinamentos. Obrigada por confiar em mim e me mostrar com todo o amor que sou capaz.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. André Zellanis, que sempre esteve disposto a ajudar, não só a mim, mas a todo nosso grupo de pesquisa. Todas as dificuldades encontradas ao longo do projeto foram superadas com mais leveza tendo o senhor ao nosso lado. Obrigada por ter embarcado nessa aventura conosco.

As professoras da banca, Profa Maria Anita Mendes e Profa. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, que tão gentilmente aceitaram participar desse momento especial e dividir suas experiências conosco. Suas contribuições serão importantíssimas.

Ao Centro de toxinas, resposta-imune e sinalização celular (CETICs) do Instituto Butantan, na pessoa do pesquisador Leo Kei Iwai, por toda ajuda e apoio na realização desse trabalho.

A todos os professores que tive o privilégio de conhecer durante os meus sete anos de ICT Unesp, mas principalmente as professoras Monica Ghislaine Oliveira Alves, Estela Kaminagakura Tango, Renata Falchete do Prado e Ana Lia Anbinder, as quais tive a honra de aprender e conviver mais de perto nesses últimos dois anos.

À todos os meus amigos por me permitirem partilhar tantos momentos nesses dois anos de pós graduação. Obrigada pelos encontros, conversas, risadas e desabafos. Nada nessa vida é possível sozinho. Meus dias foram mais felizes e leves graças a vocês.

À minha dupla, parceira e irmã de alma Bruna Carvalho, não existem palavras para te agradecer. A profissional mais dedicada e determinada que conheço, além de uma pessoa com o coração gigantesco. Desde o início fomos ponto de apoio uma da outra e nada disso seria possível sem você. Obrigada por ter estado comigo em todos os altos e baixos dessa caminhada. Que nossa amizade seja eterna.

À todos os funcionários do ICT-UNESP, em especial, à Michelle Alves. Minha parceira nos momentos de alegria e de incertezas, sempre disposta a me acolher e aconselhar. Que sorte eu e todos os alunos do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal temos em poder conviver com você.

Aos alunos de iniciação científica que tive o prazer de orientar, Kethilyn, Maria Fernanda e Paulo. Obrigada por me permitirem ensinar e aprender todos os dias. Não tenho dúvidas do futuro brilhante que vocês têm pela frente.

Aos alunos do laboratório de proteômica da Unifesp, especialmente ao Murilo Salardani, por ter me apresentado ao mundo da proteômica. Uma das maiores vivências da pós graduação foi ter conhecido profissionais incríveis como vocês, que nossa parceria gere muitos frutos.

Ao professor Felipe Oliveira por ter se disponibilizado a nos ajudar durante finais de semana e feriados. Obrigada por todo conhecimento, companhia e troca que tivemos durante o processo.

Aos participantes da pesquisa que toparam conversar, fornecer material e responder vários formulários, mesmo na correria do dia a dia. Muito obrigada.

A todos os pacientes que já atendi durante meus anos de Unesp. Eu não estaria aqui hoje se não tivessem me confiado suas dores e aflições. Obrigada por confiarem em mim como profissional.

A todos, enfim, que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Faria NC. Análise proteômica da saliva de usuários de cigarro eletrônico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

O cigarro eletrônico, também conhecido como e-cig, tem sido amplamente utilizado nos últimos anos, principalmente pela população mais jovem. Substâncias citotóxicas e carcinogênicas podem estar presentes em sua composição, no entanto, pouco se sabe sobre os riscos do seu uso. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil proteico da saliva de usuários de cigarro eletrônico por meio de estudo proteômico e as possíveis alterações salivares desses indivíduos. Para tanto, os participantes foram divididos em dois grupos: Grupo Cigarro Eletrônico (GCE), composto por 25 vaporizadores regulares e exclusivos de e-cig, e Grupo Controle (GCO), constituído por 25 indivíduos não fumantes e não vaporizadores de e-cig, pareados por sexo e idade ao GCE. Todos os participantes foram submetidos a exame clínico e coleta de saliva não estimulada para verificação da sialometria e avaliação do proteoma salivar. As amostras foram aliquotadas e submetidas às seguintes análises: viscosidade salivar, pH, capacidade tampão e mensuração da cotinina salivar realizada por meio do teste imunoenzimático (ELISA) utilizando *Cotinine Enzyme Immunoassay Kit* (Salimetrics). O perfil etílico dos pacientes foi avaliado por meio do teste AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) e por perguntas referentes ao consumo de álcool. Já o perfil de consumo do e-cig foi traçado por meio de perguntas referentes ao uso dos dispositivos e teste de concentração de monóxido de carbono no ar expirado. A análise proteômica foi realizada utilizando a metodologia *shotgun* e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Os resultados obtidos, uma vez que não possuíam distribuição normal, foram submetidos ao teste de Mann Whitney. Foi observada maior concentração de CO exalado, maior concentração salivar de cotinina, maior pontuação no AUDIT, menor viscosidade salivar e resultado desfavorável na oximetria. Em relação ao proteoma salivar, 48 proteínas foram específicas do GCE, sendo que 3 das proteínas desse conjunto estão diferencialmente expressas nesse grupo. Conclui-se que os usuários de cigarro eletrônico apresentam maiores índices de consumo de bebida alcoólica e uma menor viscosidade salivar, alterações importantes na capacidade respiratória demonstrada pelo aumento da concentração de CO no ar expirado e diminuição da oximetria e altos níveis de cotinina presentes na saliva. Além disso, a maior abundância de proteínas, como Glutathione S-transferase P, Cadeia J de imunoglobulina e Acetina desidrogenase, sugerem uma resposta do organismo ao aumento do estresse oxidativo, presença de componentes inflamatórios e alterações microbiológicas salivares que podem favorecer o desenvolvimento de condições patológicas futuras.

Palavras-chave: Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina; Saliva; Proteoma; Espectrometria de Massas; Cotinina.

ABSTRACT

Faria NC. Proteomic analysis of electronic cigarette users' saliva [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The electronic cigarette, also known as e-cig, has been widely used in recent years, especially by younger populations. Cytotoxic and carcinogenic substances may be present in its composition; however, little is known about the risks of its use. The aim of this study was to evaluate the protein profile of saliva from electronic cigarette users through proteomic analysis and the possible salivary alterations in these individuals. For this purpose, participants were divided into two groups: the Electronic Cigarette Group (ECG), composed of 25 regular and exclusive e-cig users, and the Control Group (CG), consisting of 25 non-smokers and non-e-cig users, matched by sex and age to the ECG. All participants underwent clinical examination and unstimulated saliva collection for salivary flow rate measurement and evaluation of salivary proteome. The samples were aliquoted and subjected to the following analyses: salivary viscosity, pH, buffer capacity, and measurement of salivary cotinine performed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Cotinine Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics). The participants' alcohol consumption profile was assessed using the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) and questions related to alcohol consumption. The e-cig consumption profile was traced through questions related to device usage and testing for carbon monoxide concentration in expired air. Proteomic analysis was performed using shotgun methodology and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS). Since the obtained results did not follow a normal distribution, they were subjected to the Mann-Whitney test. A higher concentration of exhaled CO was observed, along with a higher salivary concentration of cotinine, higher scores on the AUDIT, lower salivary viscosity, and an unfavorable result on oximetry. Regarding the salivary proteome, 48 proteins were specific to GCE, with 3 of these proteins being differentially expressed in this group. It is concluded that electronic cigarette users have higher rates of alcohol consumption and lower salivary viscosity, important alterations in respiratory capacity demonstrated by increased CO concentration in expired air and decreased oximetry, and high levels of cotinine present in saliva. Furthermore, the higher abundance of proteins such as Glutathione S-transferase P, Immunoglobulin J chain, and Acetyl-CoA dehydrogenase, suggest an organism response to increased oxidative stress, presence of inflammatory components, and salivary microbiological alterations that may favor the development of future pathological conditions.

Keywords: Electronic nicotine delivery systems; Saliva; Proteome; Mass spectrometry; Cotinine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenças entre as gerações dos cigarros eletrônicos	20
Figura 2 – Mensuração de CO do ar expirado.....	27
Figura 3 – Saliva coletada em tubo estéril e aliquotada em microtubo estéril	29
Figura 4 – Mensuração da viscosidade e pH salivar	30
Figura 5 – Esquema da diluição seriada do Cotinine Standart	31
Figura 6 – Esquema da mensuração da concentração de proteínas totais	33
Figura 7 – Esquema do processo de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida	34
Figura 8 – Níveis de cotinina no GCE e GCO	45
Figura 9 – Diagrama de Venn: Proteínas exclusivas e compartilhadas.....	46
Figura 10 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas compartilhadas.....	51
Figura 11 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas do GCE	52
Figura 12 – Heatmap do GCE demonstrando as proteínas e suas abundâncias	54
Figura 13 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas do GCO	55
Figura 14 – Heatmap do GCO demonstrando as proteínas e suas abundâncias.....	57
Figura 15 – Test t: Proteínas diferencialmente expressas.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação do grau de risco do uso do álcool segundo o AUDIT.....	26
Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn	46
Quadro 3 – Proteínas diferencialmente expressas em GCO e GCE	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados sobre o consumo de e-cig do grupo GCE	39
Tabela 2 – Dados sobre os componentes presentes no e-cig do grupo GCE	40
Tabela 3 – Relação entre álcool e uso do e-cig no grupo GCE	41
Tabela 4 – Consumo de álcool nos grupos GCE e GCO	42
Tabela 5 – Dados clínicos dos grupos GCE e GCO	43
Tabela 6 – Dados das salivas coletadas nos grupos GCE e GCO	43
Tabela 7 – Proteínas mais abundantes no GCE	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina	17
2.2 Saliva e biomarcadores.....	20
2.3 Proteômica e Espectrometria de massas	22
3 PROPOSIÇÃO	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Aspectos éticos	25
4.2 Seleção da amostra.....	25
4.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão.....	27
4.4 Preparo dos participantes	28
4.5 Coleta da saliva e avaliação quantitativa	28
4.6 Avaliação qualitativa	29
4.7 Concentração de cotinina salivar.....	30
4.8 Proteômica salivar (<i>shotgun</i>).....	31
4.8.1 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.....	34
4.8.2 Extração de proteínas e dessalinização das amostras	35
4.9 Espectrometria de massas Exploris 480	36
4.10 Análise bioinformática	37
4.11 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Caracterização e análise dos grupos.....	39
5.2 Análise da cotinina salivar.....	44
5.3 Análise proteômica	45
6 DISCUSSÃO	60

7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	76
ANEXO.....	81

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde uma doença crônica, sendo a maior causa de adoecimento e morte evitável no mundo (INCA, 2022a; WHO, 2023a). As doenças tabaco relacionadas são responsáveis por aproximadamente 8 milhões de mortes a cada ano (WHO, 2023b).

A Resolução RDC nº 14/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu o uso de alguns aditivos que tinham como intuito mascarar o sabor e aroma ruins, além de diminuir a irritabilidade da fumaça para os não fumantes nos cigarros industrializados, tendo como objetivo reduzir a atratividade desses produtos (ANVISA, 2012).

Além disso, graças à implementação das políticas de prevenção e conscientização, o uso dos cigarros industrializados no Brasil vem diminuindo desde meados da década de 80 (INCA, 2022b). Entretanto, esta tendência tem se mostrado inversa na população jovem, que de forma crescente e cada vez mais cedo, experimenta o tabaco em sua forma tradicional ou por meio de formas alternativas, como o narguilé e os cigarros eletrônicos, também conhecidos como e-cig, *vape* ou *pod* (Figueiredo et al., 2016; Vogel et al., 2018).

A saliva é um fluido biológico constituído por água, proteínas, substâncias inorgânicas e substâncias orgânicas (Liu, Duan, 2012). Fundamental na manutenção do equilíbrio bucal, a saliva tem como suas principais funções atuar como uma barreira protetora contra patógenos, além de iniciar o processo digestivo e participar da lubrificação da cavidade bucal (Humphrey, Williamson, 2001). Além de ser um biofluido complexo e multifuncional, possui coleta simples, não invasiva, de baixo custo e com transporte e armazenamento relativamente fácil (Wei et al., 2011). Seu uso na identificação de possíveis biomarcadores e microrganismos tem sido cada vez mais explorado, apresentando um alto potencial de monitoramento da saúde da população (Bessonneau et al., 2017).

A proteômica é o campo de pesquisa que envolve a análise de proteínas em larga escala (Liu et al., 2013). Seu principal objetivo é a caracterização detalhada do conteúdo proteico de determinado espécime, identificando sequências de proteínas e quantificando os componentes proteicos de uma amostra biológica (Bensimon et al.,

2012).

Alguns autores relacionam a presença de proteínas na saliva com doenças e síndromes em humanos como, por exemplo, carcinoma de células escamosas bucal (Bonne, Wong, 2012). Por esse motivo, a análise desse biofluido se faz necessária para identificação de moléculas e sua possível correlação com patologias, possibilitando a obtenção de um diagnóstico precoce, além de prognóstico e tratamento individualizado aos pacientes.

A utilização indiscriminada dos cigarros eletrônicos representa um problema de saúde pública mundial. Embora alguns ensaios *in vitro* tragam informações importantes sobre os impactos do seu uso na saúde sistêmica (Berkelhamer et al., 2019; Sinha et al., 2022), estudos envolvendo biomarcadores, tais como o presente estudo, podem contribuir para o melhor entendimento dos impactos gerados na saúde bucal de seus usuários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistemas Eletrônicos de Liberação de Nicotina (SELNs)

Com a proposta inicial de auxiliar na cessação tabágica, os Sistemas Eletrônicos de Liberação de Nicotina (SELNs) emergiram como uma forma alternativa aos cigarros convencionais e seu consumo tem aumentado exponencialmente no decorrer dos anos (Vogel et al., 2018). Os SELNs são conhecidos por diversos nomes e comercializados em variados formatos e tamanhos. Embora apresentem diferentes composições e modelos, são basicamente compostos por um cartucho ou tambor, uma resistência, um nebulizador e um sensor eletrônico alimentados por uma bateria de lítio (CDC, 2023). Ao utilizar, os usuários acionam esse sensor e inalam o aerossol criado pelo aquecimento dos flavorizantes que estão armazenados no interior dos dispositivos (Grana et al., 2014).

A enorme variedade de *designs*, cores e flavorizantes com que esses dispositivos são comercializados, assim como a pouca disseminação de informações sobre os efeitos prejudiciais causados pelo seu uso, favorecem a experimentação pelos adolescentes e adultos jovens (Dutra et al., 2014). Segundo pesquisa realizada em 2022, a prevalência do uso de cigarros eletrônicos na população brasileira é de quase 20% entre os adultos jovens, com idade de 18 a 24 anos, sendo mais comum nas regiões Centro-Oeste e Sul (Menezes et al., 2023).

Os SELNs são considerados por seus usuários e fabricantes menos prejudiciais à saúde quando comparados aos cigarros convencionais, já que não ocorre queima direta do tabaco (Alqahtani et al., 2020). No entanto, existem controvérsias quanto a esse assunto. Seus flavorizantes ou *e-liquids* são geralmente formados por uma mistura de água, aromatizantes (com sabores e aromas de frutas, cítricos, etc.), nicotina em diversas concentrações, propilenoglicol e glicerina vegetal (Farsalinos et al., 2015). Embora alguns aromatizantes estejam naturalmente presentes em certos alimentos e sejam geralmente considerados seguros para consumo em temperatura ambiente, é importante observar que, quando submetidos ao aquecimento, alguns desses compostos podem passar por alterações em sua

estrutura, tornando-se instáveis e potencialmente prejudiciais à saúde humana (Ooi et al., 2019).

Além dos componentes já citados, também são encontrados nitrosaminas, metais pesados, formaldeído, acetaldeído, acroleína, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e acetonas, substâncias consideradas citotóxicas e/ou carcinogênicas (IARC, 2023; Williams M et al., 2013). Essas substâncias podem estar presentes diretamente na composição dos *e-liquids* ou serem formadas devido ao seu aquecimento em altas temperaturas (Famele et al., 2015).

A inalação destes compostos possui efeitos prejudiciais aos sistemas respiratório, cardiovascular e também à mucosa bucal (Brownson et al., 2016; Schwarzmeier et al., 2020; St Hellen et al., 2017). Culturas de células expostas aos aerossóis formados pelos *e-liquids* tiveram viabilidade celular reduzida, além do aumento da produção de citocinas, aumento da apoptose celular e também do estresse oxidativo (Travis et al., 2023).

A análise do microbioma salivar de 119 usuários de e-cig mostrou maior abundância da bactéria Gram-negativa *Porphyromonas gingivalis* entre usuários de cigarros eletrônicos em comparação com fumantes de cigarros convencionais ou não fumantes (Thomas et al., 2022). Um estudo piloto realizado em 20 participantes que trocaram os cigarros convencionais pelos cigarros eletrônicos, demonstrou um aumento estatisticamente significativo na inflamação gengival, que pode ser explicado pela alta variação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias *IL-8* e *IL-1b* observada nesses indivíduos (Wadia et al., 2016). Também é possível encontrar na literatura um relato demonstrando que usuários de *e-cig* apresentam maiores índices de doença periodontal quando comparados a não usuários (Jeong et al., 2020).

Já em relação à cárie dentária, um estudo *in vitro* mostra que a combinação entre a viscosidade dos *e-líquids* e produtos químicos presentes nos sabores adocicados podem aumentar o potencial cariogênico dos usuários de e-cig, ao aumentarem a adesão microbiana ao esmalte e auxiliarem no processo de desmineralização dos elementos dentários (Kim et al., 2018).

Outro fator preocupante é o consumo de nicotina. A nicotina, um alcalóide líquido, volátil e incolor, é muito solúvel em lipídios, sendo absorvida de forma rápida pela pele, mucosa bucal, nasal e pelos pulmões (Kataoka et al., 2009). Sua distribuição aos órgãos e tecidos ocorre de maneira rápida e ampla, sendo

biotransformada em uma série de metabólitos pelas enzimas hepáticas (80 a 90%) e em menor grau nos pulmões e rins, sendo a cotinina o principal metabólito encontrado (Fonseca et al., 2012; Perez-Ortuño et al., 2015)

Alguns flavorizantes podem conter nicotina em quantidades equivalentes a um maço com 20 cigarros convencionais (Willett et al., 2019). Um estudo realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos EUA demonstrou que 99% dos dispositivos comercializados no país contêm nicotina na sua composição e que alguns fabricantes não disponibilizam informações sobre a presença ou não da nicotina nos rótulos, sendo que alguns dispositivos são comercializados como livres da substância mesmo contendo nicotina na composição (CDC, 2012).

Os níveis de cotinina presentes na saliva dos usuários dos SELNs são similares aos de fumantes de cigarros convencionais (Etter et al., 2014). O “sal de nicotina”, formado pela associação de nicotina e ácido benzóico, reduz o pH dos flavorizantes e, conseqüentemente, torna o vapor produzido menos áspero e incômodo ao ser inalado, facilitando o uso dos dispositivos por longos períodos (Harvanko et al., 2020).

O uso de dispositivos que contenham nicotina durante a adolescência pode prejudicar partes do cérebro responsáveis pela atenção, aprendizagem, humor e controle de impulsos (Almeida-da-Silva et al., 2021). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a exposição à nicotina pode afetar negativamente, além do sistema nervoso, também os sistemas respiratório, imunitário e cardiovascular, principalmente quando a exposição ocorre durante períodos críticos de desenvolvimento (McGrath-Morrow et al., 2020).

Os jovens tendem a utilizar esses dispositivos em idade cada vez mais precoce e, associado ao consumo de altas doses de nicotina muitas vezes presentes nos flavorizantes, tornam-se cada vez mais dependentes e propensos a desenvolver alterações sistêmicas graves (Overbeek et al., 2020; Vogel et al., 2019). Além disso, também é possível correlacionar o uso do e-cig com um maior consumo de bebidas alcoólicas, onde os usuários relatam um maior desejo e uso do e-cig em conjunto com o álcool (Yang et al., 2022).

Além da inalação de substâncias prejudiciais ao organismo, seu uso também pode causar acidentes como explosões e incêndios, culminando em lesões graves (Seitz et al., 2015).

Figura 1 – Diferenças entre as gerações dos cigarros eletrônicos



Fonte: Adaptado de CDC: "E-cigarette, or vaping, products visual dictionary".

2.2 Saliva e biomarcadores

A saliva é um líquido biológico fundamental para a saúde e o bem-estar humanos, que contribui para homeostase e funções como lubrificação da mucosa, proteção e manutenção da integridade bucal, além de auxiliar na formação do bolo alimentar (Llena-Puy et al., 2006). O fluxo e a capacidade tampão neutralizam os ácidos oriundos dos alimentos ou metabolismo bacteriano, mantendo o pH neutro e equilibrando os processos de desmineralização e remineralização dos dentes (Bardow et al., 2001). A produção total deriva de glândulas salivares maiores, glândulas salivares menores e do fluido crevicular, sendo produzida entre 600 e 1200 ml diariamente (Boroumand et al., 2021). A saliva é um biofluido constituído majoritariamente por água, mas contém uma variedade de compostos, como proteínas/peptídeos, muco, ácidos nucleicos, eletrólitos, hormônios e uma variedade de imunoglobulinas (Chiappin et al., 2007; Humphrey, Williamson, 2001).

A redução das funções salivares pode acarretar em diversas consequências para a saúde bucal, entre elas a dificuldade na deglutição e fala, aumento do risco de cáries dentárias, lesões da mucosa bucal, infecções fúngicas oportunistas e doença periodontal (Hassona, Scully, 2016; Müller et al., 2007; Pedersen et al., 2018).

Biomarcadores são definidos como moléculas possíveis de serem mensuradas e utilizadas como indicador de um processo biológico normal ou patológico (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Marcadores moleculares podem ser DNA, RNA, metabólitos ou proteínas, sendo úteis no diagnóstico precoce, prognóstico e estadiamento de doenças (Füzéry et al., 2013). A análise dos biomarcadores gera informações acerca dos mecanismos das doenças e possíveis tecidos e sistemas acometidos, além de indicarem a suscetibilidade individual dos pacientes (Nicholson, Lindon, 2008).

O interesse na saliva como amostra biológica tem avançado nos últimos anos e tem o potencial de se tornar uma matriz de primeira escolha (Santos, 2014). A utilização de técnicas pouco invasivas, relativamente simples e de baixo custo para sua coleta, fazem com que a saliva seja uma ótima opção para estudo, uma vez que também é promissora na identificação de biomarcadores da mucosa bucal, assim como alterações gênicas e metabólicas que podem preceder ou indicar o surgimento de patologias (Bessonneau et al., 2017; Washio, Takahashi, 2016; Zhang, Wen, 2012). Além disso, o risco de contração de infecções durante a coleta é mínimo e pode ser realizada em situações onde é difícil a obtenção de outro tipo de amostra, como por exemplo, em crianças, pacientes com necessidades especiais e pessoas ansiosas (Santos, 2014).

Estudos demonstram que biomarcadores salivares podem ser detectados durante o desenvolvimento de câncer, como câncer de pâncreas, de mama e de pulmão (Li et al., 2012; Zhang et al., 2010; Agha-Hosseini et al., 2009). A busca por proteínas específicas em fluidos corporais tem demonstrado grande importância na medicina preventiva. Por suas características dinâmicas, diversas e por refletirem a fisiologia celular, oferecem alto potencial como biomarcador para aplicação de rotina (Liu et al., 2013).

A saliva contém mais de 2.000 proteínas e peptídeos que estão envolvidos em uma infinidade de funções biológicas diferentes na cavidade bucal (Bassim et al., 2012). A identificação e a quantificação das proteínas podem favorecer a capacidade

de prover diagnósticos e prognósticos mais específicos, auxiliar na escolha do melhor tratamento de forma individualizada e monitorar a resposta dos pacientes (Schiess et al., 2009).

2.3 Proteômica e Espectrometria de massas

A espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada para identificar e quantificar compostos químicos com base em sua massa molecular e/ou características estruturais. Ela envolve a ionização das moléculas alvo, seguida pela separação e detecção dos íons com base em sua relação carga-massa (m/z) (Kulyyassov et al., 2021). Trata-se de uma ferramenta extremamente poderosa e versátil, amplamente utilizada em uma variedade de áreas, incluindo química analítica, bioquímica, proteômica, metabolômica, farmacologia e outras. Ela permite a identificação de compostos desconhecidos, o estudo de estruturas moleculares e a quantificação precisa de substâncias em amostras complexas (Larance, Lamond, 2015).

Os espectrômetros de massas são aparelhos formados por uma fonte de ionização, que converte os analitos presentes nas amostras em íons, um analisador de massas, que separa os íons de acordo com sua razão m/z e um detector que registra os íons de acordo com os valores obtidos (Han et al., 2008). Essa técnica geralmente é associada à cromatografia ou outros meios de separação para melhor determinação da composição das amostras estudadas (Saurina, Sentellas, 2019).

As proteínas são moléculas presentes nas estruturas das células responsáveis pelo mecanismo regulatório e metabolismo celular. Tem como algumas de suas características serem altamente dinâmicas, modificando-se ao longo dos diversos processos celulares, como a proliferação celular por exemplo (Larance, Lamond, 2015).

O proteoma celular nada mais é do que o conjunto de proteínas expressas diretamente a partir das informações codificadas no DNA (Schwanhausser et al., 2011). A análise proteômica realizada por meio da espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida consiste na digestão das proteínas presentes nos

espécimes, utilizando enzimas como a tripsina, seguida da separação, ionização e mensuração da relação m/z dos peptídeos fragmentados, seguido pelo estudo dessas moléculas (Domon, Aebersold, 2010).

Na análise proteômica podem ser utilizadas duas metodologias, a *Top Down* e a *Bottom-up*. A abordagem *Bottom-up*, que abrange a metodologia *shotgun*, inclui a separação dos peptídeos obtidos após digestão tripsínica das proteínas presentes nas amostras por meio da cromatografia líquida, seguida então da espectrometria de massas (Barbosa et al., 2012). É a abordagem mais utilizada, já que permite a identificação de extensos grupos de proteínas em amostras complexas, como a saliva por exemplo, além de não necessitar do conhecimento prévio da composição proteica dessas amostras (Domon, Aebersold, 2010).

Portanto, a aplicação da espectrometria de massas para identificação de proteínas pode ser uma ferramenta valiosa na análise da expressão proteica de células em diversas condições, incluindo situações de estresse oxidativo. Esse método nos permite compreender como esse comportamento pode impactar as funções celulares de um organismo (Aebersold, Mann, 2003; Domon, Aebersold, 2010).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Analisar as diferenças no perfil proteico da saliva entre usuários de cigarros eletrônicos e um grupo controle por meio de um estudo proteômico. Além disso, investigar as possíveis alterações salivares em indivíduos que utilizam cigarros eletrônicos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar proteínas na saliva de usuários de cigarro eletrônico e correlacioná-las com possíveis implicações clínicas;
- b) Identificar alterações salivares em usuários de cigarro eletrônico em comparação com não usuários e relacionar essas alterações com possíveis implicações para a saúde bucal;
- c) Caracterizar o perfil tabágico dos usuários de e-cig;
- d) Verificar a correlação entre o perfil etílico e o uso do e-cig;
- e) Caracterizar a presença e as concentrações de cotinina na saliva de usuários de e-cig.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos (CEPH) do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos (ICT-UNESP) (CAAE: 36911420.0.0000.0077, número do parecer: 4.397.780) (Anexo A). Este trabalho encontra-se vinculado ao Auxílio Regular FAPESP nº2020/10362-0.

4.2 Seleção das amostras

Os participantes foram convidados a participar da pesquisa a partir de convites nas redes sociais, nas universidades da região e aplicativos de mensagens. Todos os participantes foram esclarecidos sobre a proposta do trabalho, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) em duas vias e foram submetidos a exame físico extra e intra-bucal no momento das coletas.

A amostra de conveniência foi definida de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos por Ye et al., 2020. Segundo a Correção de Bonferroni, para significância de 0,01 e poder 90%, o tamanho amostral total deverá ser de 48 pacientes. Assim, os 50 participantes do estudo foram divididos em:

- a) Grupo Cigarro Eletrônico (GCE): 25 indivíduos vaporizadores regulares e exclusivos de e-cig há pelo menos 6 meses, sem alterações clínicas visíveis em mucosa bucal. Ex-fumantes de cigarro industrializado deveriam estar abstêmios há pelo menos 2 anos.
- b) Grupo Controle (GCO): 25 indivíduos não-fumantes e não usuários de e-cig, sem história pregressa de uso de cigarro industrializado e/ou cigarro eletrônico e sem alterações clínicas visíveis em mucosa.

A coleta das amostras de saliva foi realizada no ambulatório da Disciplina de Estomatologia do ICT-UNESP, na cidade de São José dos Campos-SP. Além disso,

também foram realizadas coletas nas cidades de Mogi das Cruzes-SP, Caçapava-SP e Jandira-SP, seguindo os critérios de inclusão e o preparo prévio apresentados nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Para a quantificação do grau de consumo de álcool foi utilizada a aplicação do questionário do teste AUDIT - Alcohol Use Disorder Identification Test (Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011) via Google Forms, além de perguntas referentes ao consumo de bebidas alcólicas (idade de início, frequência, tipo e tempo de uso) (Apêndice B). Este teste é composto por 10 questões pontuadas separadamente e que, quando somadas, obtém um escore final para cada indivíduo, classificando-o de acordo com a seguinte Tabela:

Quadro 1 – Classificação do grau de risco do uso do álcool segundo o AUDIT

Grau de risco	Pontuação do AUDIT
Consumo de baixo risco	0 a 7 pontos
Uso de risco	8 a 15 pontos
Uso nocivo	16 a 19 pontos
Provável dependência	20 a 40 pontos

Fonte: Elaborado pela autora por meio das informações do artigo de Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011.

Para estabelecer o perfil tabágico do GCE, os participantes responderam a um segundo questionário formulado pela equipe, baseado na experiência anterior do grupo de pesquisa com o assunto, também disponibilizado via Google Forms, que continha perguntas referentes ao consumo do e-cig (frequência de uso, tempo de uso e tipo de flavorizantes) (Apêndice C).

Por fim, para estabelecer o perfil clínico, no momento da coleta das amostras de saliva, todos os participantes do GCE e GCO realizaram aferição da frequência cardíaca, oximetria, glicemia capilar e teste da concentração de monóxido de carbono (CO) do ar expirado, por meio do aparelho piCO + Smokerlyzer® (Bedfont Scientific Ltd, Reino Unido), considerando abstinência tabágica quando a concentração de CO

foi menor que 6 partes por milhão (Figura 2).

Figura 2 – Mensuração de CO do ar expirado



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

Inclusão: indivíduos maiores de 18 anos que concordaram em participar da pesquisa ao assinarem o TCLE de acordo com os critérios dos grupos estabelecidos no item 4.1.

Não inclusão: indivíduos fumantes duais, que faziam uso de cigarro industrializado e de e-cig simultaneamente, que realizavam tratamento para doença autoimune ou que já haviam sido submetidos a qualquer tipo de tratamento oncológico, cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico em quaisquer órgãos ou sistemas.

Exclusão: casos que não apresentaram amostras suficientes para as análises propostas e os que recusaram em assinar o TCLE.

4.4 Preparo dos participantes

Os pacientes foram orientados a não realizar escovação dentária ou ingerir quaisquer alimentos 2 horas antes da coleta, bem como estar há 12 horas sem ingerir bebidas alcoólicas. Para reduzir a contaminação com detritos bucais, os pacientes realizaram bochecho com água destilada por 1 minuto (Alves et al., 2021).

4.5 Coleta da saliva e avaliação quantitativa

A coleta da saliva se deu de forma não estimulada, em ambiente calmo, arejado e sem interrupções. Sentados de forma ereta, os participantes depositaram a saliva em tubo cônico plástico descartável e estéril (Falcon®, Rio de Janeiro) durante 5 minutos, e a sialometria (ml/min) foi calculada frente a razão da quantidade de saliva obtida em ml dividida por 5 minutos (Navazesh, Kumar, 2008) (Figura 3).

Em seguida, foram feitas alíquotas de 1ml de saliva acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5ml (Figura 3), os quais foram hermeticamente fechados e imediatamente colocados em nitrogênio líquido, até o posterior armazenamento em freezer -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP.

As amostras salivares foram acondicionadas e transportadas segundo o anexo da resolução CFM N° 2.074/2014, publicada no D.O.U. de 28 de Julho de 2014, Seção I, p. 91-2, que normatiza o acondicionamento de material humano coletado para procedimentos diagnósticos a serem transportados para outra localidade que não a da sede da coleta, e também baseado nos critérios estabelecidos pela Anvisa para realização deste procedimento pelos laboratórios clínicos na seção 6.1.10 Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA/Ministério da Saúde) – RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005.

Figura 3 - Saliva coletada em tubo estéril e aliqotada em microtubo estéril



Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Avaliação qualitativa

A análise qualitativa da saliva foi realizada no ambulatório de Estomatologia do Departamento de Biocências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (ICT-Unesp), Campus de São José dos Campos, levando em consideração as seguintes propriedades:

- a) pH salivar: mensurado por meio do kit de papel indicador de pH universal (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cada fita foi mergulhada na saliva por 2 segundos e a análise da sua coloração foi feita de acordo com a tabela padrão fornecida pelo fabricante (Figura 4).
- b) Viscosidade salivar: foi considerada a fiabilidade salivar, descrita por Murineanu em 2011 (Figura 4).
- c) Capacidade tampão: em eppendorfs descartáveis, 1 ml de saliva de cada uma das amostras foi adicionado a 3 ml de ácido clorídrico 0,005

N. O tubo foi agitado levemente e deixado em repouso durante 10 minutos. Em seguida, o pH final da mistura foi mensurado por meio das tiras do kit de papel indicador de pH universal (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Figura 4 - Mensuração da viscosidade e pH salivar



Fonte: Elaborado pela autora

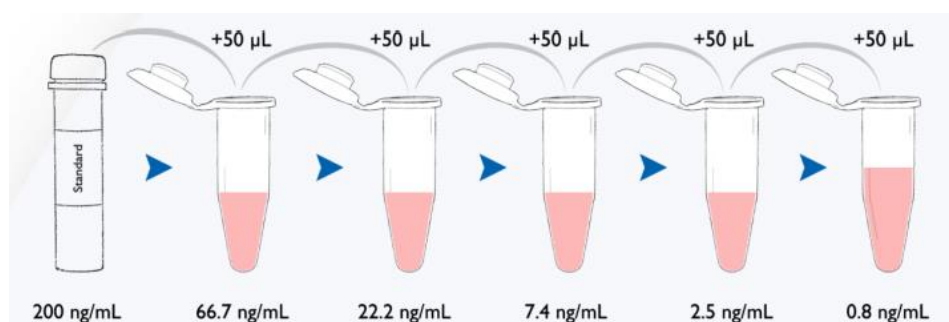
4.7 Concentrações de cotinina salivar:

Os níveis de cotinina salivar foram detectados por análise do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) por meio do kit Cotinine Enzyme Immunoassay Kit – Quantitative High Sensitivity (Salimetrics Inc., State College, EUA) no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (Unesp) – Câmpus de São José dos Campos.

Os reagentes e a placa de microtitulação presentes no kit ficaram em temperatura ambiente por pelo menos 90 minutos antes do início do teste, conforme indicado pelo fabricante. As amostras de saliva também foram descongeladas em temperatura ambiente e colocadas em vórtex para agitação previamente ao

experimento. O tampão de lavagem foi preparado adicionando 100 mL do seu conteúdo (Wash Buffer Concentrate 10X) em 900 mL de água deionizada à temperatura ambiente. A solução padrão de cotinina (Cotinine Standard) foi submetida a uma diluição seriada para a construção da curva padrão. Seis microtubos distintos foram identificados, contendo concentrações específicas de cotinina, a saber: 200 ng/mL, 66,7 ng/mL, 22,2 ng/mL, 7,4 ng/mL, 2,5 ng/mL e 0,8 ng/mL. Cada etapa desse processo foi conduzida com rigor para garantir resultados confiáveis e representativos (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da diluição seriada do Cotinine Standart



Fonte: Salimetrics®.

Previamente ao experimento, foi definido o layout das placas utilizadas, sendo que a curva padrão, as amostras de saliva dos usuários de vape e as amostras de saliva do grupo controle foram realizadas em duplicata. As amostras de saliva do grupo vape foram diluídas em 1:10 (10 µL de saliva para 90 µL de diluente de ensaio), enquanto as amostras do grupo controle foram utilizadas puras.

O conjugado enzimático 1:300 foi diluído adicionando 50 µL a 15 mL de diluente de ensaio. O tubo com a mistura foi vortexado por alguns minutos e, posteriormente, foi adicionado 100 µL da mistura a cada poço previamente definidos na placa utilizando uma pipeta multicanal. Também foi adicionado a todos os poços,

20 µl das amostras em duplicata e 100 µL de Antisoro (Cotinine Antiserum). As placas foram então cobertas com a tampa adesiva fornecida pelo fabricante e agitadas em agitador pré-aquecido continuamente a 500 rpm por 90 minutos a 37°C.

Prosseguiu-se com quatro lavagens utilizando o tampão de lavagem (agora em concentração 1X), pipetando 300 µL em cada poço e descartando o conteúdo. Depois de devidamente secos, 200 µL da solução de substrato TMB foram adicionados em cada poço. As placas foram agitadas por 5 minutos a 500 rpm em um agitador orbital e incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 25 minutos. Posteriormente, 50 µL da solução de parada (Stop Solution) foram adicionados a cada poço.

A placa foi colocada mais uma vez em agitador orbital, por 3 minutos, a 500 rpm. Nessa etapa, a coloração verde tornou-se amarela gradativamente. As leituras das placas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis com comprimento de onda de 450nm, com correção de filtro secundário em 620nm, dentro de 10 minutos após adicionado a solução de parada e os dados foram exportados para o programa Excel (Microsoft, Redmond, EUA).

4.8 Proteômica salivar (*shotgun*)

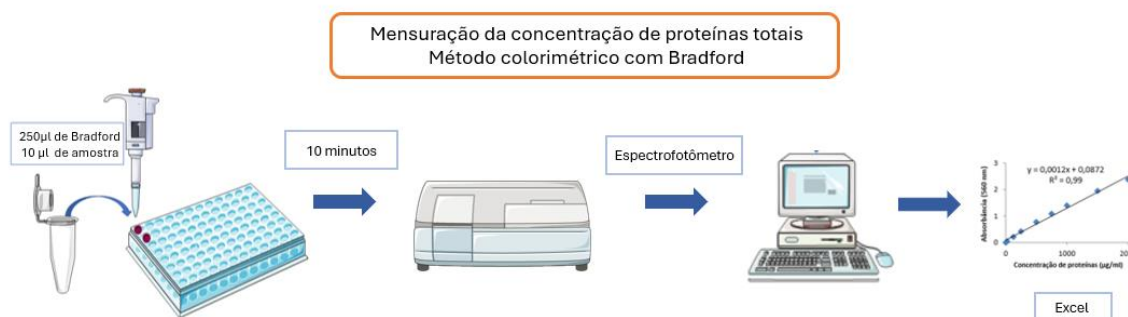
A análise do proteoma salivar foi realizada no laboratório de proteômica funcional coordenado pelo Professor André Zelanis Palitot Pereira, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Talim, São José dos Campos, juntamente com sua equipe.

Inicialmente, as amostras de saliva foram descongeladas em temperatura ambiente, colocadas em vórtex para agitação por 10 segundos e, em seguida, centrifugadas em 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, no qual foi acrescentado tampão de lise celular (CHAPS 2%, NaCl 150mm e HEPES 50mm) com pH 7,5.

Para estimar o teor proteico das amostras, as análises foram feitas em triplicata, utilizando placas de 96 poços. Inicialmente, uma curva padrão foi construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (Sigma, Estados Unidos). Foram então adicionados em cada poço 250µl do reagente de Bradford (Sigma, Estados Unidos) e 5µl de amostra salivar. Após a pipetagem de todos os poços previamente definidos, as placas foram cobertas com papel alumínio para impedir a entrada de luz e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm e os dados encontrados foram exportados para o programa Microsoft Excel (Microsoft Inc., Redmond, EUA). Posteriormente, foi utilizada a equação da reta para o cálculo da concentração proteica das amostras em µg/µl.

Figura 6 – Esquema da mensuração da concentração de proteínas totais



Fonte: Elaborado pela autora utilizando Servier Medical Art.

4.8.1 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

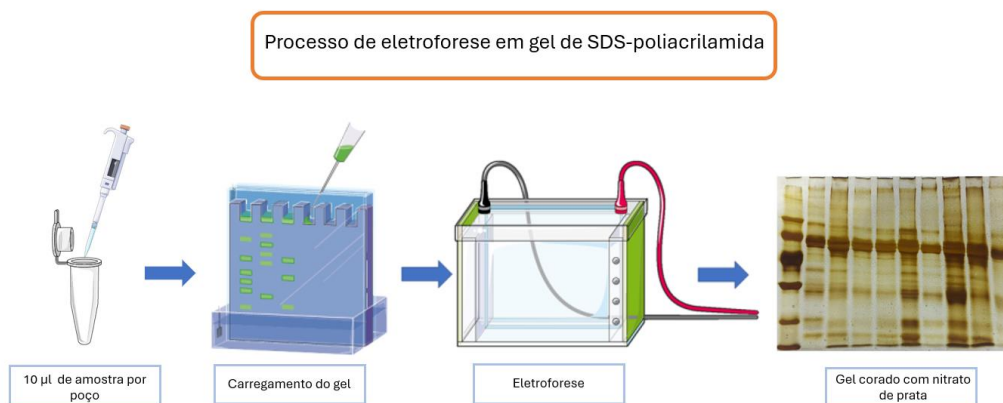
A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida foi realizada utilizando géis preparados homogeneamente e verticalmente com poliacrilamida (30% T, 2,6% C),

cloridrato de trometamina (Tris HCl) 1,5M pH 8,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, persulfato de amônio 10%, tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,05% e água destilada.

As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e submetidas à eletroforese, em temperatura ambiente, na voltagem de 160V e corrente de 40mA utilizando conjunto de minigel de eletroforese Mini-Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). O primeiro poço de cada gel foi carregado com 10 µg de Precision Plus Protein™ All Blue (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), também pré-aquecido, para servir como padrão de referência. Foram necessários 10µg de proteínas por poço.

Após as proteínas presentes nas amostras alcançarem a parte inferior do gel, a corrente elétrica foi desligada e as placas de vidro do conjunto separadas. Os géis foram então lavados com água destilada e submetidos ao processo de revelação de bandas proteicas utilizando nitrato de prata.

Figura 7 – Esquema do processo de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida



Fonte: Elaborado pela autora utilizando Servier Medical Art.

4.8.2 Extração de proteínas e dessalinização das amostras

A 100 µg do teor proteico das salivas foram adicionados GuHCl (hidroclorato de guanidina, preparado em Hepes 50 mM, pH 7.5) para uma concentração final de 3M. Em seguida, foi adicionado DTT (1,4-dithiothreitol, preparado em Hepes 50 mM pH 7,5 – Sigma, EUA) para uma concentração final de 5mM e incubado por 1 hora por 65°C, para que houvesse a redução das pontes dissulfeto nas proteínas.

Para a alquilação das sulfidrilas livres, foi adicionado IAA (2-iodoacetamida, preparado em Hepes 50 mM, pH 7.5– Sigma, EUA) para uma concentração final de 15 mM e, em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Decorrido os 30 minutos, foi adicionado DTT para uma concentração final de 15mM e as amostras foram incubadas por mais 20 minutos a temperatura ambiente para que fosse consumido o excesso de IAA da etapa anterior.

Para remoção dos sais oriundos da etapa de desnaturação proteica, foi realizada uma precipitação das proteínas adicionando-se 8 volumes de acetona à -20°C e 1 volume de metanol à -20°C. Em seguida as amostras foram incubadas a -80°C por 2 horas. Decorrido esse período, foi realizada uma centrifugação à 14000 x g, 4°C por 10 minutos, e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 1 volume de metanol, seguido de centrifugação à 14000 x g, 4°C por 10 minutos. Essa etapa foi repetida por mais 2 vezes.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado para secar a temperatura ambiente. Uma vez que o *pellet* estava seco, as proteínas foram solubilizadas em 10 µL de NaOH 100 mM e, em seguida, foram adicionados 80 µL de H₂O e 10 µL de HEPES 500 mM pH 7,5. Finalmente, foi adicionado tripsina (*Mass Spec grade* - Promega) seguindo a proporção de 1:100 (enzima:proteínas, m/m) e incubado à 37°C *overnight*.

Após esse período, foi adicionado ácido fórmico para uma concentração final de 5%, a fim de acidificar as amostras e inativar a tripsina. Para remoção do sal NaOH, utilizamos colunas com membranas de C18 (*Stage Tip*). Para dessalinização dos peptídeos tripsínicos, foi utilizado o método de micro extração em fase sólida, com

membranas C-18 montadas em ponteiros P1000. Brevemente, para equilibrar a coluna, primeiramente foram adicionados 500 µL de metanol à membrana, e em seguida 500 µL de H₂O MilliQ.

Para o condicionamento das colunas, foram adicionados 500 µL de ácido fórmico 0,1%. Uma vez que as membranas estavam preparadas, foram adicionadas as amostras. A dessalinização foi realizada após 2 lavagens com ácido fórmico 0,1%. Para a eluição dos peptídeos, a coluna foi lavada 2X com acetonitrila 50% em ácido fórmico 0,1% e em seguida 1X com acetonitrila 100% para a eluição total dos peptídeos presentes na coluna.

As amostras dessalinizadas foram secas em *SpeedVac*. Após a secagem, os peptídeos foram quantificados pelo método Smith (ácido bicinconínico ou BCA) (Smith et al., 1985) e submetidos a espectrometria de massas.

4.9 Espectrometria de massas Exploris 480

Essa etapa das análises foi realizada em parceria com o Laboratório de Proteômica do Centro de toxinas, resposta-imune e sinalização celular (CeTICS), localizado no prédio do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan em São Paulo.

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas do tipo Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo líquido em nanoescala nLC Vanquish Neo (Thermo Fisher Scientific). O espectrômetro está acoplado a uma fonte Easy Flex com uma coluna analítica comercial nanoLC Acclaim PepMap NEO de dimensões 150mm x 75µm, empacotada com resina C18 de 2 µm (Thermo Fisher Scientific) e coluna trap nanoLC Acclaim PepMap 100 C18 de dimensões 20mm x 75µm e diâmetro da partícula 3µm (Thermo Fisher Scientific).

Foram injetados de 0,1 a 0,5 µg do extrato de peptídeos que foram eluídos da coluna com um gradiente de 5 - 40% em 100 minutos de solvente B (acetonitrila 90%, ácido fórmico 0,1%) a um fluxo de 200 nL/min.

As análises foram realizadas em um gradiente de 2 - 42% em 90 minutos de solvente B (acetonitrila 90%, ácido fórmico 0,1%) a um fluxo de 300 nL/min. A fonte eletrospray foi operada a 2,2 kV. O espectrômetro de massas está acoplado ao sistema FAIMS (Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry) que permite a separação de íons na fase gasosa baseados em suas diferentes características de mobilidade, que por sua vez é dependente da forma e da carga dos íons, sob a influência de um campo elétrico alto e baixo.

A mistura peptídica foi analisada pela aquisição dos espectros no modo full MS com uma resolução de 120.000 para a determinação de MS1, com um tempo máximo de injeção no modo automático na faixa de 375 a 1500 m/z. Os 20 picos mais intensos foram selecionados automaticamente por meio da aquisição de Data-Dependent Acquisition (DDA) para a subsequente aquisição dos espectros de MS/MS utilizando duas voltagens de compensação configuradas no sistema FAIMS. No modo -45V e -60V com uma resolução de 15.000, um tempo máximo de injeção de 40 ms, um intervalo de 120 a 2.000 m / z e uma exclusão dinâmica de 45 segundos.

4.10 Análise bioinformática

Os dados brutos do espectrômetro de massas (arquivos do tipo RAW) provenientes da análise *shotgun* foram analisados utilizando o software MaxQuant. Uma taxa de falso positivos (*False Discovery Rate* - FDR) de 1% foi permitida para as identificações de proteínas e peptídeos. Os dados obtidos foram interrogados contra um banco de dados utilizando a estratégia *target-decoy*. O banco de dados (*target database*) é restrito à taxonomia *Homo sapiens*.

Os valores quantitativos correspondentes às proteínas identificadas pela ferramenta MaxQuant foram transformados tomando-se o logaritmo na base 2 e, em seguida, submetidos à normalização por quantis, utilizando a biblioteca “*preprocessCore*” disponível na plataforma R/Bioconductor. A biblioteca Limma presente na mesma plataforma foi utilizada para a análise comparativa entre as situações experimentais. As proteínas cujos p-valores ajustados foram ≤ 0.05 e $\log_2$ (fold change) >1 e <-1 foram consideradas como diferencialmente expressas.

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos para os grupos GCE e GCO foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Uma vez que os mesmos não possuíam distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann Whitney. Toda a análise estatística foi feita com auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização e análise dos grupos

O grupo GCE foi formado por 25 participantes, sendo 14 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com média de idade de $27 \pm 7,57$ anos. Dentre eles, 6 participantes relataram ser ex-fumantes de cigarro convencional, estando abstêmios há 3 ± 1 ano. Em média, os participantes fazem uso do vape há $2,06 \pm 1,32$ anos.

Como mostra a Tabela 1, a amostra do presente estudo concentra-se em indivíduos que fazem uso do dispositivo com uma frequência elevada, sendo que 40% dos participantes utilizam mais de 10 vezes ao dia e 52% dos participantes fazem uso diariamente dos dispositivos. Além disso, grande parte dos participantes alega que seu tempo de vaporização varia de 1 a 2 minutos a cada uso.

Tabela 1 - Dados sobre o consumo de e-cig do grupo GCE

(Continua)

Variáveis	GCE
n	25 (100%)
Consumo semanal	
1 a 2 dias na semana	5 (20%)
3 a 4 dias na semana	7 (28%)
Diariamente	13 (52%)
Frequência diária de uso	
3 a 4 vezes no dia	4 (16%)
5 a 6 vezes no dia	6 (24%)
7 a 10 vezes no dia	3 (12%)
> 10 vezes no dia	12 (48%)

Tabela 1 - Dados sobre o consumo de e-cig do grupo GCE

(Conclusão)

Variáveis	GCE
Tempo de vaporização	
Cerca de 1 minuto	10 (40%)
1 a 2 minutos	11 (44%)
3 a 5 minutos	4 (16%)

Legenda: GCE (grupo cigarro eletrônico). Variáveis descritas na forma de n (número de participantes - %). NI: não informado. Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 2, é possível observar que a quantidade de flavorizantes utilizada varia em média de $8,62 \pm 12,65$ ml por dia de uso, sendo a grande maioria de sabores adocicados. Já a concentração de nicotina fica em torno de $37,20 \pm 61,10$ mg por dia de uso.

Tabela 2 - Dados sobre os componentes presentes no e-cig do grupo GCE

Variáveis	GCE
n	25 (100%)
Flavorizante (ml) por dia de uso	$8,62 \pm 12,65$
Nicotina (mg) por dia de uso	$37,20 \pm 61,10$
Tipos de flavorizante	
Frutas	12 (48%)
Frutas e menta	4 (16%)
Menta	2 (8%)
Menta e ice	3 (12%)
NI	4 (16%)

Legenda: GCE (grupo cigarro eletrônico). Variáveis flavorizantes e concentração de nicotina descritas na forma de média $\pm$ desvio padrão e tipos de flavorizantes descritos na forma de n (número de participantes - %). NI: não informado. Fonte: Elaborada pela autora.

A maior parte dos indivíduos alega fazer uso simultâneo do cigarro eletrônico e de bebidas alcoólicas e que o consumo de álcool, consequentemente, aumenta o consumo do dispositivo (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre álcool e uso do e-cig no grupo GCE

Variáveis	GCE
n	25 (100%)
Uso do e-cig e álcool simultaneamente?	
Sim	19 (76%)
Às vezes	2 (8%)
Não	0 (0%)
NI	4 (16%)
Sim	13 (52%)
Às vezes	4 (16%)
Não	4 (16%)
NI	4 (16%)
Uso do álcool aumenta o uso do e-cig em?	
1 a 2 vezes mais	6 (24%)
3 a 4 vezes mais	8 (32%)
5 a 6 vezes mais	2 (8%)
Não sei dizer	5 (20%)
NI	4 (16%)

Legenda: GCE (grupo cigarro eletrônico). Variáveis descritas na forma de n (número de participantes - %). NI: não informado. Fonte: Elaborada pela autora.

Ao compararmos os grupos GCE e GCO utilizando o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos, essa tendência também se confirma e é possível observar que existe diferença estatisticamente significativa quando analisamos o AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test), sendo que o grupo GCE obteve um

resultado quase duas vezes maior quando comparado ao grupo GCO (Tabela 4).

Tabela 4 - Consumo de álcool nos grupos GCE e GCO

Variáveis	GCE	GCO	p-value
AUDIT	7,76 ± 4,81	4,04 ± 2,34	0,003*
Média de doses durante o consumo			
1 a 2 doses	0 (0%)	10 (40%)	
3 a 4 doses	10 (40%)	6 (24%)	
5 a 6 doses	5 (20%)	4 (16%)	NA
7 a 9 doses	3 (12%)	3 (12%)	
≥ 10 doses	3 (12%)	0 (0%)	
NI	4 (16%)	2 (8%)	
Tipo de bebida			
Cerveja	13 (52%)	10 (40%)	
Destilado	5 (20%)	10 (40%)	NA
Vinho	5 (20%)	1 (4%)	
NI	2 (8%)	4 (16%)	

Legenda: GCO (grupo controle). GCE (grupo cigarro eletrônico). Teste AUDIT descrito na forma de média ± desvio padrão. * representa $p \leq 0,05$. Demais variáveis descritas na forma de n (número de participantes - %). NA: não se aplica. NI: não informado. Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação aos dados clínicos dos participantes (Tabela 5), foi possível observar diferença estatisticamente significativa na oximetria e na concentração de monóxido de carbono (CO) no ar expirado para o GCO, que obteve melhores resultados em relação ao GCE.

Tabela 5 - Dados clínicos dos grupos GCE e GCO

Variáveis	GCO	GCE	p-value
n	25 (100%)	25 (100%)	
Feminino	11 (44%)	11 (44%)	NA
Masculino	14 (56%)	14 (56%)	
Idade	26,80 ± 6,67	27 ± 7,57	0,942
Frequência cardíaca	81,88 ± 14,53	77,72 ± 14,26	0,295
Oximetria (% de O ₂)	97,58 ± 1,04	96,76 ± 1,23	0,036*
Glicemia capilar (mg/dl)	101,09 ± 13,19	96,21 ± 17,88	0,121
Concentração de CO (ppm)	1,48 ± 0,92	2,12 ± 1,59	0,015*

Variáveis: GCO (grupo controle). GCE (grupo cigarro eletrônico). n (número de participantes) e sexo são descritas na forma de número total (%). Variáveis: Idade, frequência cardíaca, oximetria, glicemia capilar e concentração de CO são descritas na forma de média ± desvio padrão. * representa $p \leq 0,05$. NA: não se aplica. Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, foram realizadas as análises quantitativas e qualitativas da saliva coletada e os resultados podem ser encontrados na Tabela 6. Apesar de não ser possível observar diferenças na sialometria, pH inicial e capacidade tampão entre os grupos, houve mudanças na viscosidade da saliva ($p=0,048$).

Tabela 6 - Dados das salivas coletadas nos grupos GCE e GCO

(continua)

Variáveis	GCE	GCO	p-value
n	25 (100%)	25 (100%)	NA

Tabela 7 - Dados das salivas coletadas nos grupos GCE e GCO

(continua)

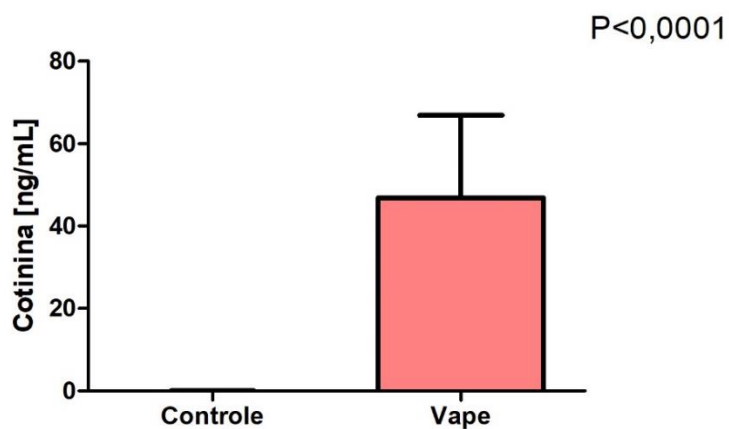
Variáveis	GCE	GCO	p-value
Sialometria (ml/min)	0,90 ± 0,27	1,24 ± 1,69	0,782
Viscosidade (cm)	2,04 ± 1,36	2,68 ± 0,9	0,048*
pH salivar - inicial	7,12 ± 0,67	7,04 ± 0,57	0,755
pH salivar - final	4,36 ± 0,73	4,02 ± 0,67	0,257

Variáveis: GCO (grupo controle). GCE (grupo cigarro eletrônico). n (número de participantes) descrito na forma de número total (%). Variáveis: sialometria, viscosidade, pH salivar inicial e pH salivar final são descritas na forma de média ± desvio padrão. * representa $p \leq 0,05$. NA: não se aplica. Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Análise da cotinina salivar

Os níveis de cotinina foram detectados por análise imunoenzimática (Elisa) utilizando Cotinine Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics, State Collge, PA, EUA) e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis, com um comprimento de onda de 450nm e 620nm. Observa-se que o GCE ($46,88 \pm 20,01$) apresenta uma quantidade elevada de cotinina, muito maior quando comparado ao GCO ($0,01173 \pm 0,04292$) (Figura 8).

Figura 8 – Níveis de cotinina no GCE e GCO

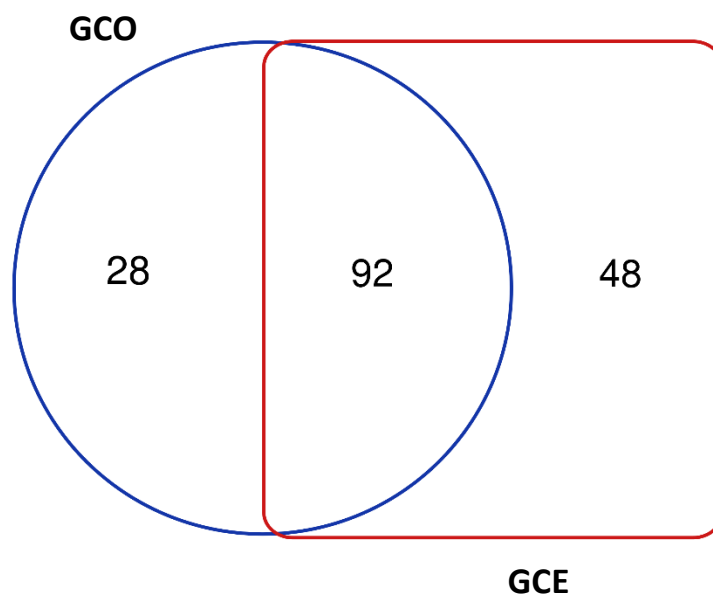


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Análise proteômica

Obtivemos um total de 168 proteínas presentes nas amostras de saliva. Todas as proteínas encontradas em ambos os grupos do estudo foram alocadas em um diagrama de Venn para avaliarmos sua distribuição entre os mesmos. Com a análise do diagrama de Venn (Figura 9), observamos que o GCE apresentou um maior número de proteínas específicas, totalizando 48 proteínas, enquanto o GCO apresentou 28 proteínas específicas. Por outro lado, foram totalizadas 92 proteínas comuns aos dois grupos. Todas as proteínas quantificadas podem ser observadas no Quadro 2.

Figura 9 – Diagrama de Venn: Proteínas exclusivas e compartilhadas



Legenda: O quadrado de contorno vermelho representa o GCE e o círculo de contorno azul representa o GCO. A intersecção entre ambos representa as proteínas em comum. Fonte: Elaborado pela autora por meio do software de acesso aberto Bioinformatics & Evolutionary Genomics.

Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn

(continua)

GCO + GCE	GCO	GCE
Elongation factor 2	Galectin-7	Protein S100-A11
Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	WD repeat-containing protein 1	Alpha-actinin-4
ERO1-like protein alpha	Heat shock 70 kDa protein 1A	Chromosome partitioning protein transcriptional regulator
Large ribosomal subunit protein uL3	Large ribosomal subunit protein uL4	Desmocollin-2
Pyruvate kinase PKM	Eukaryotic initiation factor 4A-I	Fibrinogen gamma chain
Immunoglobulin kappa light chain	Plastin-2	Fructose-bisphosphate aldolase A
Large ribosomal subunit protein uL3	Large ribosomal subunit protein uL4	Desmocollin-2
Pyruvate kinase PKM	Eukaryotic initiation factor 4A-I	Fibrinogen gamma chain

Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn

(continuação)

Immunoglobulin kappa light chain	Plastin-2	Fructose-bisphosphate aldolase A
Alpha-amylase 1A	Alpha-crystallin B chain	Protein disulfide-isomerase
Elongation factor 1-alpha 1	Cofilin-1	Envelope glycoprotein
Mucin-5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Hemopexin
Clathrin heavy chain 1	Prosaposin	Cathepsin G
Extracellular matrix protein 1	Tripartite motif-containing protein 29	Immunoglobulin J chain
Immunoglobulin lambda constant 2	Programmed cell death 6-interacting protein	Keratin, type II cytoskeletal 6B
Involucrin	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
Vitamin D-binding protein	Proteasome activator complex subunit 1	Glutathione S-transferase P
Annexin A3	Coronin-1A	Fatty acid synthase
Calcium-activated chloride channel regulator 4	Tropomodulin-3	Calpain-1 catalytic subunit
Interleukin-1 receptor antagonist protein	Core histone macro-H2A.1	Uridylate-specific endoribonuclease
Heat shock protein HSP 90-beta	Alpha-actinin-1	Sciellin
Fatty acid-binding protein 5	Cytochrome b-245 heavy chain	Desmoglein-1
Plastin-3	Nucleobindin-2	6-phosphogluconate dehydrogenase
Plectin	Transcobalamin-1	Kallikrein-1
Triosephosphate isomerase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Cystatin-A
14-3-3 protein sigma	Beta-2-microglobulin	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
Peroxiredoxin-2	Thioredoxin	Hemoglobin subunit beta
Prelamin-A/C	Carbonic anhydrase 6	Alpha-2-macroglobulin
Heat shock cognate 71 kDa protein	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Peroxiredoxin-5, mitochondrial

Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn

(continuação)

Prelamin-A/C	Carbonic anhydrase 6	Alpha-2-macroglobulin
Heat shock cognate 71 kDa protein	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Peroxiredoxin-5, mitochondrial
Prolactin-inducible protein	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	Elongation factor 1-gamma
Histone H2A type 1-H	BPI fold-containing family A member 2	14-3-3 protein gamma
14-3-3 protein zeta/delta		Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial		Plakophilin-3
Ezrin		Aldo-keto reductase family 1 member B10
Tubulin alpha-1B chain		Heat shock protein HSP 90-alpha
Cystatin-S		Annexin A8-like protein 1
Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor		Protein disulfide-isomerase A3
Immunoglobulin heavy constant alpha 1		Protein Niban 2
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K		Beta-2-glycoprotein 1
Haptoglobin		10 kDa heat shock protein, mitochondrial
Envoplakin		Tubulin beta-4B chain
Isocitrate dehydrogenase [NADP]		4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
Polymeric immunoglobulin receptor		Glutamine--tRNA ligase
Catalase		Nicotinamide phosphoribosyltransferase
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1		Filamin-B
Zinc-alpha-2-glycoprotein		Lamin-B1
Transaldolase		Aldehyde dehydrogenase 1A1
Actin, cytoplasmic 2		Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2
Neuroblast differentiation-associated protein AHNK		Matrix metalloproteinase-9

Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn

(continuação)

Glucose-6-phosphate isomerase		Filamin-A
Serotransferrin		CYFIP-related Rac1 interactor B
Protein S100-A9		
Annexin A2		
Protein S100-A14		
Periplakin		
Serpin B5		
Lactoperoxidase		
Cystatin-B		
Plakophilin-1		
Protein-glutamine gamma- glutamyltransferase E		
Neutrophil defensin 3		
Small ribosomal subunit protein eS1		
Myosin-9		
Cystatin-D		
Annexin A1		
Sulfhydryl oxidase 1		
Cornifin-A		
Chloride intracellular channel protein 1		
Transitional endoplasmic reticulum ATPase		
Adenylyl cyclase-associated protein 1		
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin		
Alpha-2-macroglobulin-like protein 1		
Lactotransferrin		
BPI fold-containing family B member 1		
Peroxiredoxin-1		
Immunoglobulin heavy variable 6-1		
Complement C4-B		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		
Transketolase		
Histone H2B type 1-M		
Phosphoglycerate mutase 1		

Quadro 2 – Proteínas salivares analisadas no diagrama de Venn

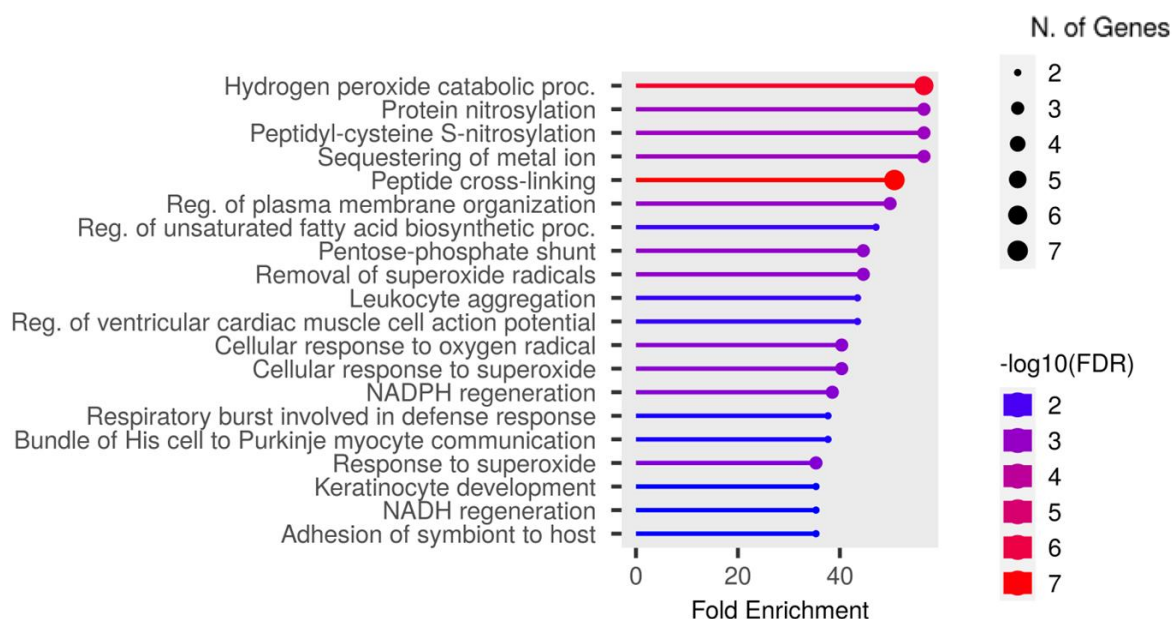
(conclusão)

Galectin-3-binding protein		
Complement C3		
Heat shock protein beta-1		
Myeloperoxidase		
Junction plakoglobin		
Lysozyme C		
Desmoplakin		
Large ribosomal subunit protein uL30		
Leukocyte elastase inhibitor		
Tubulin alpha-4A chain		
Cornulin		
Protein S100-A8		
Small ribosomal subunit protein eS8		
Small proline-rich protein 3		

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliar os processos biológicos presentes no conjunto de proteínas identificadas, realizamos uma análise de enriquecimento funcional. Para as 92 proteínas compartilhadas entre ambos os grupos, os processos biológicos envolvidos na nitrolisação de proteínas, agregação de leucócitos, resposta celular aos radicais livres de oxigênio, resposta celular aos superóxidos e outros são os mais abundantes (Figura 10).

Figura 10 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas compartilhadas

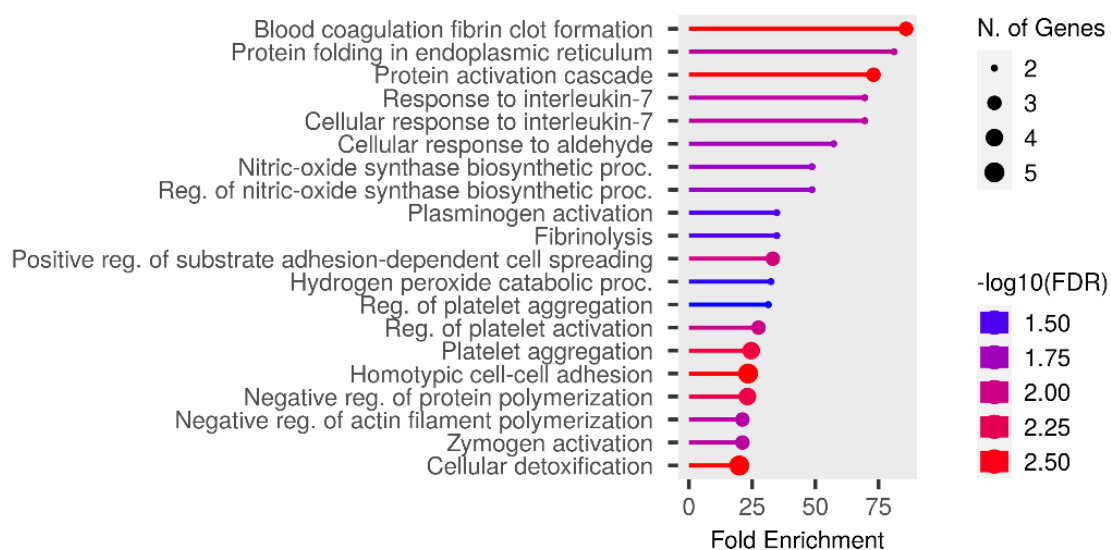


Fonte: Elaborada pela autora.

Para as 48 proteínas exclusivas do GCE, foi possível observar que estão enriquecidos os processos de cascata de ativação de proteínas, resposta celular a interleucina 7, resposta celular aos aldeídos, fibrinólise e outros (Figura 11). Na Tabela 7 é possível observar as treze proteínas mais abundantes no GCE.

Construiu-se também *heatmaps* (mapas de calor), o qual fornecem uma visualização intuitiva de uma tabela de dados. No caso, cada célula colorida corresponde a abundância de uma proteína para cada amostra salivar. É possível visualizar nos *heatmaps* proteínas distintas e que ocorreu a separação entre os grupos (Figura 12 e Figura 14).

Figura 11 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas do GCE



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Proteínas mais abundantes no GCE

(continua)

Entrada	Nome	Gene
P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1
P01591	Immunoglobulin J chain	JCHAIN
P07237	Protein disulfide-isomerase	P4HB
P02790	Hemopexin (Beta-1B-glycoprotein)	HPX
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA
P08311	Cathepsin G	CTSG
P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B	KRT6B
P31949	Protein S100-A11	S100A11
O43707	Alpha-actinin-4	ACTN4

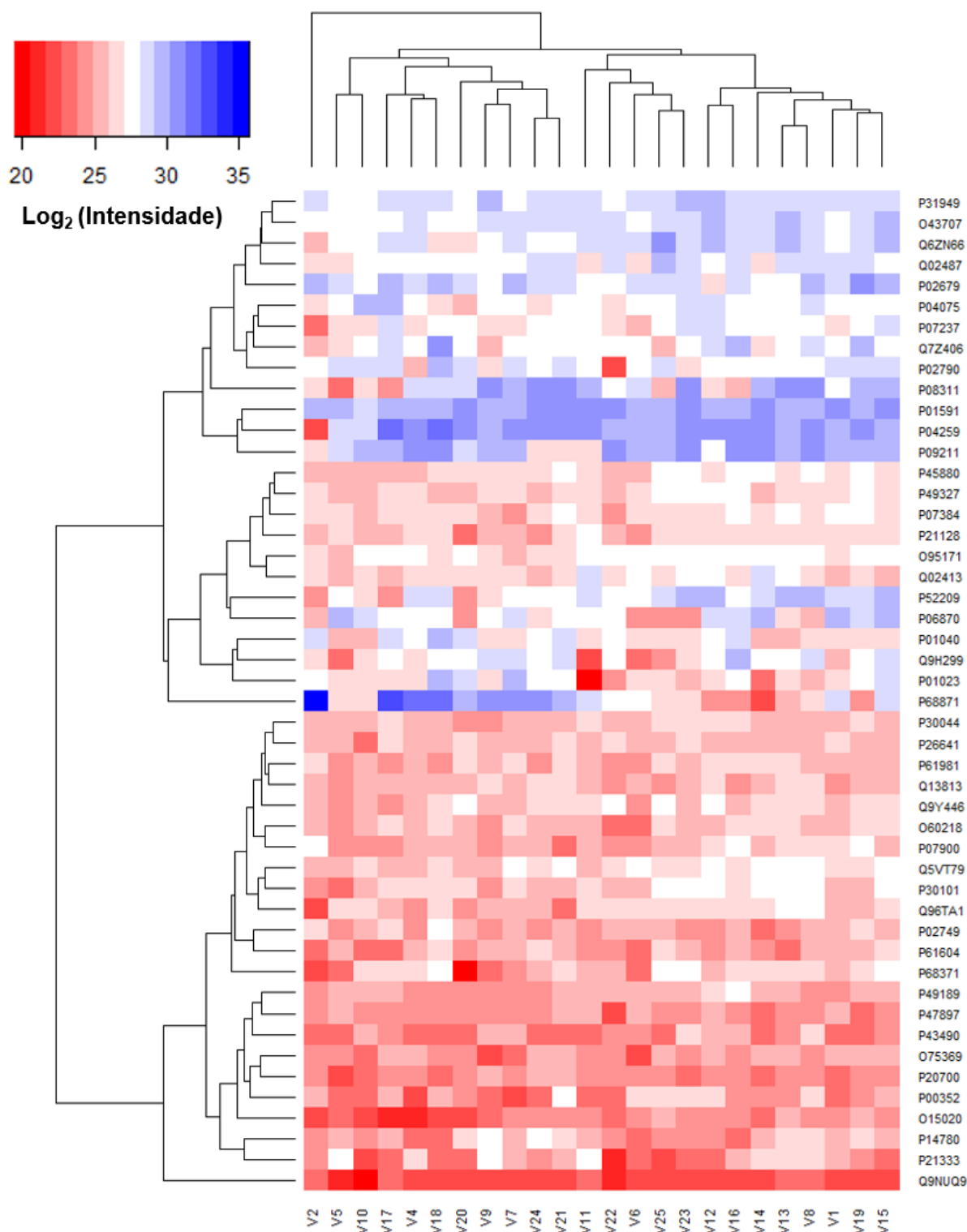
Tabela 7 – Proteínas mais abundantes no GCE

(conclusão)

Entrada	Nome	Gene
Q67N66	Acetoin dehydrogenase	STH1892
Q02487	Desmocollin-2	DSC2
Q77406	Envelope glycoprotein	env

Fonte: Elaborada pela autora.

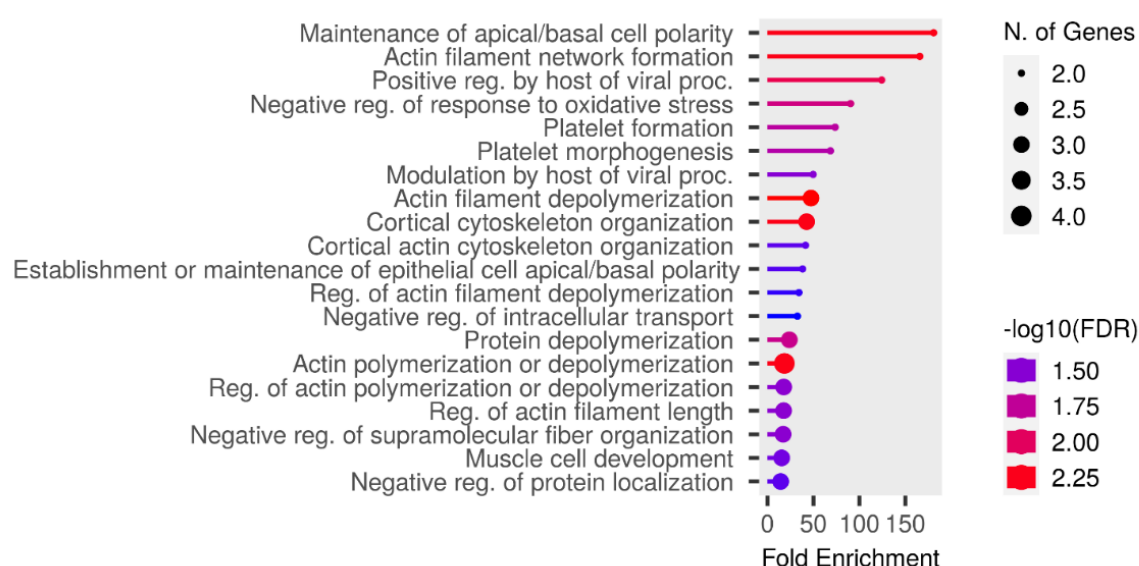
Figura 12 - *Heatmap* do GCE demonstrando as proteínas e suas abundâncias



Legenda: Coluna do lado direito contém os nomes das proteínas de acordo com o banco de dados do UniProt. Quanto mais intenso o azul nas células, maior a abundância da proteína na amostra salivar de acordo com o teste T (FDR) com $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora.

Já para as 28 proteínas exclusivas do GCO, foi possível observar que estão enriquecidos os processos relacionados com manutenção da polaridade celular, formação dos filamentos de actina, organização do citoesqueleto e outros componentes comumente encontrados nas células (Figura 13). Na Tabela 8 temos as nove proteínas mais abundantes no GCO.

Figura 13 – Processos biológicos enriquecidos nas proteínas do GCO



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Proteínas mais abundantes no GCO

(continua)

Entrada	Nome	Gene
P80303	Nucleobindin-2	NUCB2
P20061	Transcobalamin-1	TCN1
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M
P23280	Carbonic anhydrase 6	CA6

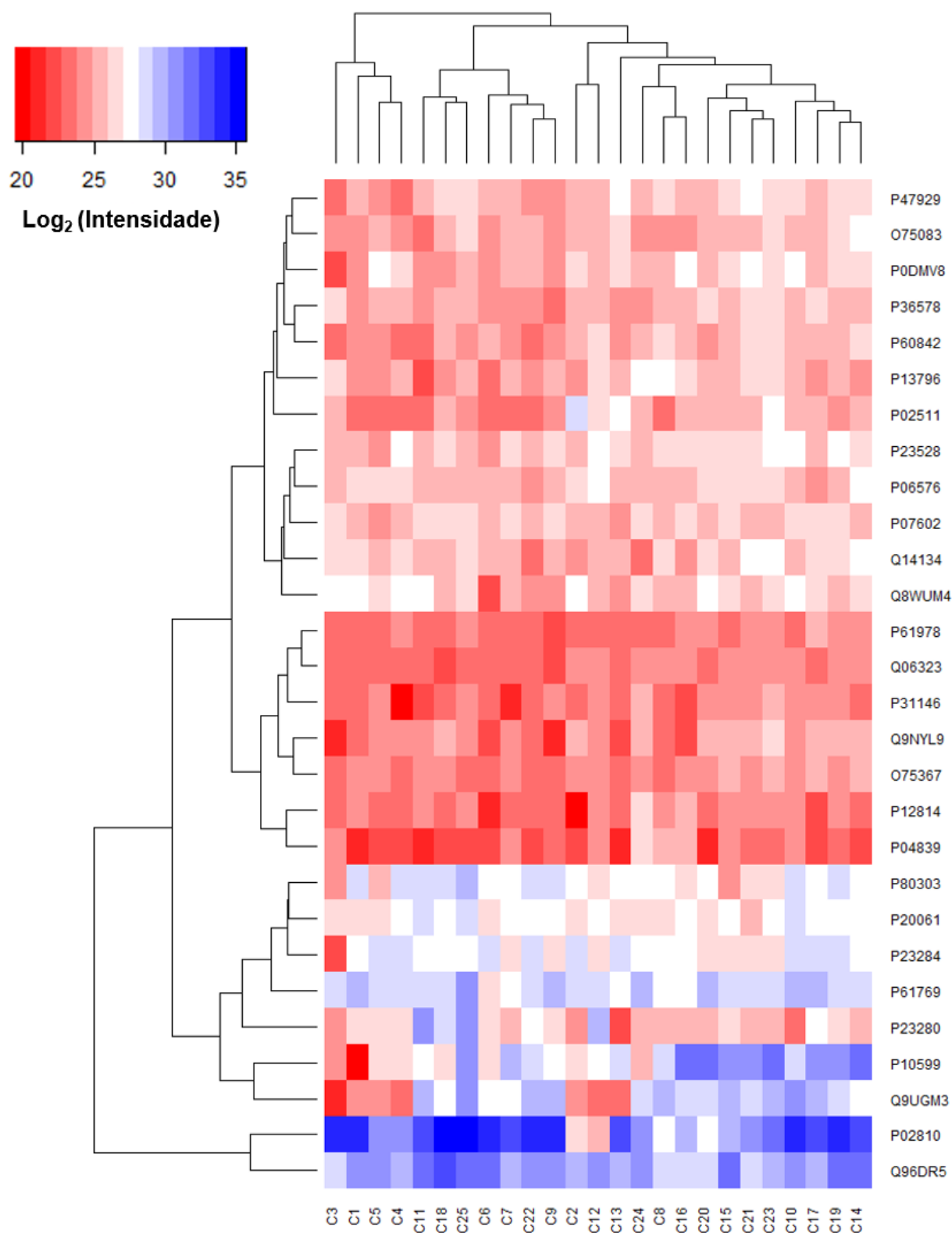
Tabela 8 – Proteínas mais abundantes no GCO

(conclusão)

Entrada	Nome	Gene
P10599	Thioredoxin (Trx)	TXN
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 (Db-s)	PRH1
Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2	BPIFA2

Fonte: Elaborada pela autora.

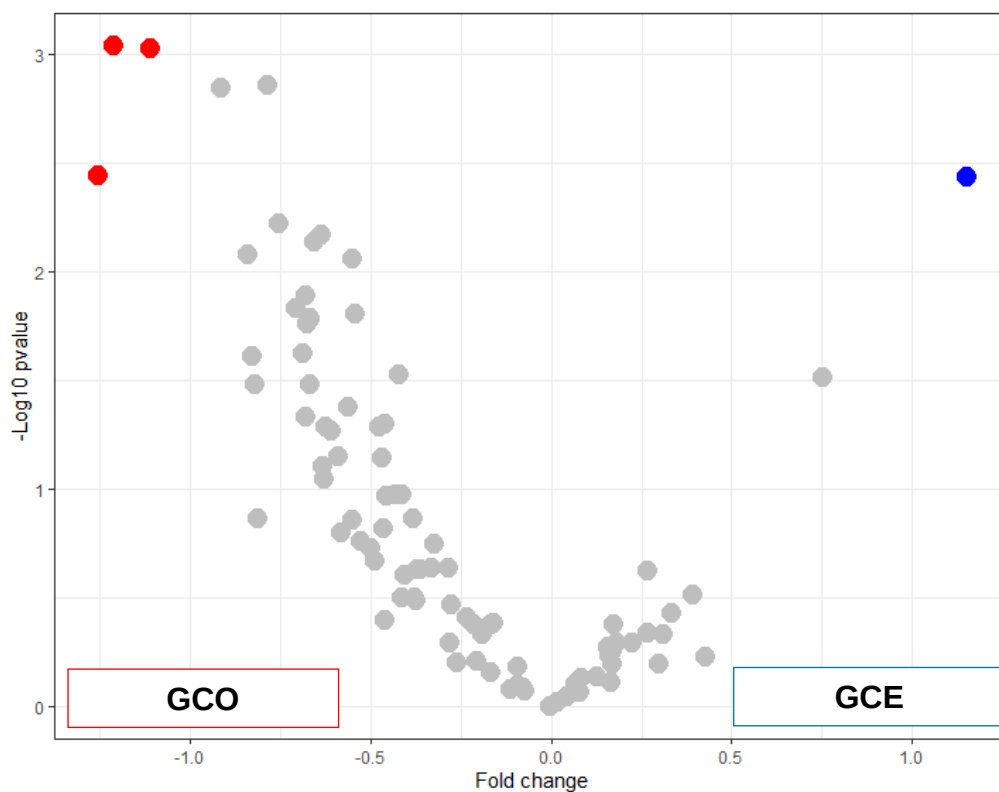
Figura 14 - Heatmap do GCO demonstrando as proteínas e suas abundâncias



Legenda: Coluna do lado direito contém os nomes das proteínas de acordo com o banco de dados do UniProt. Quanto mais intenso o azul nas células, maior a abundância da proteína na amostra salivar de acordo com o teste T (FDR) com $p < 0,05$. Fonte: Elaborado pela autora.

A comparação das proteínas presentes no GCO e GCE (Figura 15) por meio do Teste T resultou em 4 proteínas diferencialmente expressas, que podem ser encontradas no Quadro 3, sendo que as mesmas têm relação com transporte intracelular de ácidos graxos (Fatty acid-binding protein 5), modulação do citoesqueleto (Calgranulin-B), estão presentes nos queratinócitos (Cornifin-A) e, a proteína Cystatin-D mais expressa no GCE, tem como função inibir a cisteína proteinase, desempenhando um papel protetor contra proteinases da cavidade bucal.

Figura 15 - Test t: Proteínas diferencialmente expressas



Legenda: Volcano Plot evidenciando a diferença de abundancia relativa das proteínas expressas pelo GCE (azul) e GCO (vermelho). Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 3 - Proteínas diferencialmente expressas em GCO e GCE

GCO		GCE	
Gene	Proteína	Gene	Proteína
FABP5	Fatty acid-binding protein 5	P28325	Cystatin-D
S100A9	Calgranulin-B		
SPRR1A	Cornifin-A		

Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

O estudo do proteoma salivar de indivíduos usuários de cigarro eletrônico é de extrema importância para a identificação da abundância das proteínas, possibilitando a descoberta de possíveis biomarcadores, o que traz expectativas de compreender melhor os riscos que esses dispositivos oferecem e também possibilitar o diagnóstico precoce de possíveis patologias e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos pacientes a longo prazo.

Estudos prévios acerca do proteoma salivar de tabagistas, alcoolistas e usuários de outras substâncias como o crack já foram descritos na literatura (Chaiben et al., 2021; Sinha et al., 2021; Batista et al., 2019). Até o momento, não há relatos disponíveis sobre o proteoma salivar específico de usuários de cigarro eletrônico. Nossa equipe de pesquisa tem a honra de ser pioneira nessa área, enfatizando a importância significativa do presente estudo.

Pesquisas recentemente publicadas indicam que a maior parte dos usuários de vape tende a ser do sexo masculino com idade entre 18 e 24 anos, indivíduos ainda mais jovens dos que os participantes desse estudo (Martins et al., 2022). Também em concordância com esse dado, outros autores relatam que, sete anos após a introdução dos cigarros eletrônicos no mercado, aproximadamente 20% dos indivíduos com idade entre 18 e 24 anos já experimentaram o dispositivo pelo menos uma vez (Arrazola et al., 2015; CDC, 2013).

Assim como a vasta gama de cores, modelos e *designs*, os diversos tipos de flavorizantes com sabores e cheiros agradáveis também são citados como um dos principais atrativos dos cigarros eletrônicos (White et al., 2015; Morean et al., 2018). Em concordância com o estudo de Wang et al. (2020), a maioria dos participantes dessa pesquisa relata utilizar flavorizantes frutados e/ou açucarados.

Os *e-líquids* de consistência viscosa em associação com sabores adocicados, facilitam a fixação e fornecem nutrição para bactérias orais patogênicas, como o *Streptococcus mutans* por exemplo, representando um potencial risco à saúde bucal

(Kim et al., 2018). Além disso, pesquisas laboratoriais indicam que a exposição a sabores doces em comparação com sabores de mentol e tabaco tradicionais aumentam o apelo e a exposição ao produto, contribuindo para uma maior persistência e frequência de uso (Hoffman et al., 2016; Goldenson et al., 2016).

A nicotina tem meia vida plasmática curta e seu principal metabólito é a cotinina (Benowitz NL, 1996). Altas concentrações desse metabólito indicam uma significativa exposição à nicotina, podendo estar associada não apenas a dependência, mas também a efeitos deletérios no desenvolvimento cerebral e doenças cardiovasculares (Benowitz et al., 2016). Portanto, a presença de altas concentrações de cotinina na saliva dos participantes desse estudo é um dado alarmante.

Apesar de comercializado como um meio seguro para cessação tabágica, estudos demonstram que uma grande parcela dos usuários acaba utilizando o cigarro convencional junto ao cigarro eletrônico ou até mesmo associado a outras formas de tabaco, destacando que seus benefícios para saúde pública são baixos ou até mesmo inexistentes (Martins et al., 2022).

O uso do cigarro eletrônico parece estar associado a uma maior probabilidade de consumo de bebidas alcoólicas e vice versa (Lozano et al., 2021). Como podemos observar nesse estudo, o GCE obteve resultado quase duas vezes maior em relação ao resultado do teste AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test), indicando uma possível dependência, em comparação ao GCO.

Na literatura, diversas explicações para essa associação são discutidas, sendo a mais citada a busca por aceitação no grupo, especialmente entre os adolescentes, tornando-os mais susceptíveis ao uso de substâncias como tabaco e álcool (Schuler et al., 2019; Trucco, 2020). Dado que o consumo de ambos parece reforçar-se mutuamente, o uso de múltiplas substâncias surge já na adolescência, podendo favorecer o desenvolvimento de transtornos relacionados ao abuso dessas substâncias na vida adulta (Delk et al., 2019; Spoelder et al., 2015).

Os efeitos da exposição aos cigarros eletrônicos na saúde, especialmente a exposição crônica, ainda são incertos. No entanto, é possível encontrar na literatura pesquisas relatando danos oxidativos ao DNA das células epiteliais, além de relatos

de sintomas de bronquite crônica, exacerbação da asma, lesão pulmonar associada ao uso do vape, condição denominada de EVALI, e diversas outras complicações (Tomasi et al., 2023; Sund et al., 2023Mc; Connell et al., 2017).

Contudo, estudos sobre o impacto do uso desses dispositivos nas características da saliva de seus usuários ainda são escassos. Embora não tenham sido identificadas diferenças na sialometria, pH inicial e capacidade tampão entre os grupos, observaram-se alterações na viscosidade da saliva.

A viscosidade salivar está diretamente associada à quantidade de mucina presente na saliva. Essa característica desempenha um papel crucial na proteção e hidratação da mucosa bucal (Cichońska et al., 2022). Nosso estudo apontou um menor valor da viscosidade no GCE quando comparado ao GCO, sugerindo a possibilidade de alterações na composição das amostras. Contudo, até onde foi possível verificar, não foram identificadas outras pesquisas na literatura abordando esse tema.

Considerando a sialometria dos participantes da pesquisa, apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa durante as análises, os valores para o GCE foram menores quando comparados ao GCO. Esse fato pode estar associado a substâncias como o propilenoglicol e a glicerina, encontrados na composição dos flavorizantes. Tais substâncias são conhecidas por irritar as vias aéreas superiores e causar ressecamento das membranas mucosas (Callahan-Lyon, 2014).

Alguns estudos demonstram que o pH salivar pode ser afetado pelo uso dos cigarros convencionais, tendo menores valores quando comparados ao de não fumantes, o que torna o ambiente oral dos tabagistas mais ácido e favorece o processo de desmineralização dentária (Parvinem, 1984; Ömeroğlu et al., 2021). Em nossa pesquisa, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no pH da saliva dos participantes, no entanto, o valor médio do pH entre usuários de cigarros eletrônicos foi maior do que entre os não fumantes, ressaltando a importância de conduzir estudos adicionais para uma compreensão mais aprofundada do assunto.

Frente a necessidade de entender os danos celulares em curto prazo e também como o uso dos cigarros eletrônicos interfere na abundância das proteínas

presentes na saliva, a área do proteoma salivar evidencia-se como uma importante fonte de estudo. Nosso estudo foi capaz de identificar 48 proteínas específicas encontradas nas amostras de saliva dos usuários de cigarro eletrônico, sendo que das treze proteínas mais abundantes, cinco chamaram nossa atenção.

A primeira delas foi a Glutathione S-transferase P, que tem como função a conjugação de glutathione na sua forma reduzida a um grande número de eletrófilos hidrofóbicos exógenos e endógenos (Bogaards et al., 1997). Presente nos tecidos saudáveis, a glutathione é o principal antioxidante produzido pelas células (Lomaestro et al., 1995). Ela fornece proteção por meio da remoção de radicais livres ao se conjugar com os mesmos, evitando o estresse oxidativo e levando a destoxificação de xenobióticos, substâncias químicas estranhas ao organismo, ao tornar possível sua excreção (Forman et al., 2009).

Os radicais livres são compostos que podem danificar ou destruir componentes celulares importantes como o DNA, membranas, entre outros (Lomaestro et al., 1995). Estudos mostram que os componentes presentes nos flavorizantes desempenham um papel importante no aumento da produção de radicais livres oxidantes, apresentando um risco toxicológico potencial para seus usuários (Bitzer et al., 2018; Goel et al., 2015).

Embora seja um componente comum das células, valores de glutathione maiores do que o normal indicam que o ambiente está sendo submetido a intenso estresse oxidativo, o que corrobora com os estudos citados anteriormente e contradiz a falácia de que os cigarros eletrônicos são alternativas seguras ao consumo dos cigarros industrializados.

A proteína denominada Cadeia J de Imunoglobulina, também identificada exclusivamente nas amostras de saliva do GCE, tem como função a ligação da imunoglobulina M e imunoglobulina A entre si e participam da sua excreção pelas células (Uniprot). As imunoglobulinas ou anticorpos são os principais responsáveis pela proteção do organismo, presentes nos processos de reconhecimento, ligação e remoção de antígenos (Abbas et al., 2000).

A Imunoglobulina M (IgM) é a primeira classe a ser detectada durante uma resposta imune primária, sendo considerada um anticorpo de fase aguda. Já a

Imunoglobulina A (IgA), também presente na resposta imune do organismo, está presente em maiores concentrações nas secreções externas, como a saliva por exemplo (Barna GAO, 2001).

Outra proteína identificada foi a Cadeia gama de fibrinogênio, que além de participar da formação da matriz de fibrina, também facilita a resposta imune antibacteriana através de vias inatas e vias mediadas por células T (UniProt). Os cigarros eletrônicos induzem a inflamação e produzem radicais livres destrutivos que afetam o sistema imunológico inato e aumentam os riscos de infecções (Lerner et al. 2015). Ambas as proteínas, Cadeia J de Imunoglobulina e Cadeia gama de fibrinogênio, relacionadas com respostas do organismo a infecções e inflamação respectivamente, demonstram mais uma vez os malefícios do uso dos cigarros eletrônicos à cavidade bucal e ao organismo.

A proteína denominada de Acetoína desidrogenase, segundo estudo de Zeber et al. (2022), é produzida pelo microorganismo *Streptococcus mutans*, principal agente etiológico da cárie dentária, principalmente devido a sua habilidade de aderência às superfícies dos dentes e sua composição ácida (Loesche et al. 1986). Como já abordado anteriormente, sabe-se que o uso de flavorizantes adocicados torna os indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento de cáries dentárias (Amaral et al., 2023; Kim et al., 2018). A nicotina, presente em grandes concentrações na composição dos flavorizantes como relatam os participantes da pesquisa que fazem uso dos cigarros eletrônicos, auxilia na colonização bucal por *Streptococcus mutans*, aumentando a formação de biofilme e a viabilidade do microorganismo (Huang et al., 2015). Além disso, os aerossóis dos cigarros eletrônicos aumentam a adesão de *Streptococcus mutans* aos dentes e, conseqüentemente, sua capacidade de formar biofilme (Catala-Valentin et al., 2022; Rouabhia et al., 2020).

A Catepsina G, é uma protease que possui atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e se liga a células natural killer no reconhecimento de corpos estranhos ou células alteradas, além de participar dos mecanismos de defesa ao estimular linfócitos B e T (Bangalore et al., 1990; Yamazaki et al., 1997; Yamazaki et al., 1998). Essa proteína também pode causar piroptose de fibroblastos gengivais, morte celular programada associada a infecção por patógenos. Novamente, nos deparamos com algumas limitações neste estudo; no entanto, este

fato suscita a discussão de que o uso de cigarros eletrônicos pode estar associado a um aumento na destruição do periodonto, levando ao desenvolvimento da doença periodontal (Figueredo et al., 2021; Jun et al., 2018).

Por fim, após realizado o Teste t, houve diferença estatística para uma proteína do GCE. A Cistatina-D é uma proteína inibidora de proteinases, desempenhando papel importante na regulação das proteinases presentes na cavidade bucal, principalmente as catepsinas (Balbín et al. 1994). Altos níveis de Catepsina B são bem documentados em tumores malignos de cavidade bucal e esôfago, por exemplo, sendo um fator preditivo a um pior prognóstico quando em altas concentrações (Roshy et al., 2003; Kawasaki et al., 2002).

O aumento da abundância da proteína Cistatina-D na saliva de usuários de cigarro eletrônico pode estar relacionado a uma maior quantidade de catepsinas e proteinases presentes no ambiente, mas outros estudos precisam ser realizados sobre o assunto.

Apesar de inúmeras pesquisas acerca dos riscos que o uso dos cigarros eletrônicos possui serem publicadas todos os dias, ainda há um universo de incógnitas que envolvem o tema. A necessidade de realizar mais estudos e um acompanhamento a longo prazo dos usuários é evidente. No entanto, a urgência de implementar abordagens preventivas e educativas contra seu uso, assim como a disseminação de informações, é imprescindível.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que os usuários de cigarro eletrônico apresentam maiores índices de consumo de bebida alcoólica e uma menor viscosidade salivar, além de alterações importantes na capacidade respiratória demonstrada pelo aumento da concentração de CO no ar expirado e diminuição da oximetria. Além disso, os níveis de cotinina presentes na saliva desses indivíduos são altos, podendo indicar dependência dos seus usuários.

Além disso, este estudo revela importantes *insights* sobre os efeitos do uso dos cigarros eletrônicos na composição proteica da saliva, apontando para os riscos associados ao seu uso. a maior abundância de proteínas, como Glutathione S-transferase P, Cadeia J de imunoglobulina e Acetina desidrogenase, sugerem uma resposta do organismo ao aumento do estresse oxidativo, presença de componentes inflamatórios e alterações microbiológicas salivares que podem favorecer o desenvolvimento de condições patológicas futuras.

REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K; Pillai, Shiv; Lichtman, Andrew H. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2019. 565 p. ISBN: 978-85-352-9074-5.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. doi: 10.1038/nature01511.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Cigarro eletrônico [Internet], 2009. [Acesso 17 set 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/tabaco/cigarro-eletronico>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RESOLUÇÃO - RDC Nº 14 [Internet], 2012. [Acesso 20 jan 2024]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0014_15_03_2012.html
- Alqahtani S, Cooper B, Spears CA, Wright C, Shannahan J. Electronic nicotine delivery system-induced alterations in oral health via saliva assessment. *Exp Biol Med* (Maywood). 2020 Sep;245(15):1319-1325. doi: 10.1177/1535370220941258.
- Alves MS, Rodrigues NS, Bandeira CM, Chagas JFS, Pascoal MBN, Nepomuceno GLJT, Martinho HS, Alves MGO, Mendes MA, Dias M, Alves LAC, Almeida JD. Identification of possible salivary metabolic biomarkers and altered metabolic pathways in south american patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma. metabolites. 2021 Sep 23;11(10):650. doi: 10.3390/metabo11100650.
- Amaral AL, Lwaleed BA, Andrade SA. Electronic nicotine delivery systems (ENDS): a strategy for smoking cessation or a new risk factor for oral health? *Evid Based Dent*. 2023 Dec;24(4):188-189. doi: 10.1038/s41432-023-00929-w.
- Balbín M, Hall A, Grubb A, Mason RW, López-Otín C, Abrahamson M. Structural and functional characterization of two allelic variants of human cystatin D sharing a characteristic inhibition spectrum against mammalian cysteine proteinases. *J Biol Chem*. 1994 Sep 16;269(37):23156-62. PMID: 8083219.
- Bangalore N, Travis J, Onunka VC, Pohl J, Shafer WM. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J Biol Chem*. 1990 Aug 15;265(23):13584-8. PMID: 2116408.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Marqui AB, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2012 May-Jun;58(3):366-75. English, Portuguese. PMID: 22735231.

Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relations between medications intake, complaints of dry mouth, saliva flow rate, saliva composition and the rate of human tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* 2001 May;46(5):413-23. doi: 10.1016/s0003-9969(01)00003-6.

Barna GAO. Estudo comparativo “in vitro” entre preparações de imunoglobulina G, para uso intravenoso, obtidos de plasma humano de variadas procedências e processadas por diferentes técnicas de separação [Tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2001. 139 p.

Batista TBD, Chaiben CL, Penteado CAS, Nascimento JMC, Ventura TMO, Dionizio A, Rosa EAR, Buzalaf MAR, Azevedo-Alanis LR. Salivary proteome characterization of alcohol and tobacco dependents. *Drug Alcohol Depend*. 2019 Nov 1;204:107510. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.06.013.

Berkelhamer SK, Helman JM, Gugino SF, Leigh NJ, Lakshminrusimha S, Goniewicz ML. In Vitro Consequences of Electronic-Cigarette Flavoring Exposure on the Immature Lung. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Sep 27;16(19):3635. doi: 10.3390/ijerph16193635.

Bensimon A, Heck AJ, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:379-405. doi: 10.1146/annurev-biochem-072909-100424.

Bessonneau V, Pawliszyn J, Rappaport SM. The Saliva Exposome for Monitoring of Individuals' Health Trajectories. *Environ Health Perspect*. 2017 Jul 20;125(7):077014. doi: 10.1289/EHP1011.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.

Bitzer ZT, Goel R, Reilly SM, Elias RJ, Silakov A, Foulds J, Muscat J, Richie JP Jr. Effect of flavoring chemicals on free radical formation in electronic cigarette aerosols. *Free Radic Biol Med*. 2018 May 20;120:72-79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.020.

Bonne NJ, Wong DT. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Med*. 2012 Oct 30;4(10):82. doi: 10.1186/gm383.

Bogaards JJ, Venekamp JC, van Bladeren PJ. Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol*. 1997 Mar;10(3):310-7. doi: 10.1021/tx9601770.

Boroumand M, Olanas A, Cabras T, Manconi B, Fanni D, Faa G, Desiderio C, Messana I, Castagnola M. Saliva, a bodily fluid with recognized and potential

diagnostic applications. *J Sep Sci.* 2021 Oct;44(19):3677-3690. doi: 10.1002/jssc.202100384.

Brownson EG, Thompson CM, Goldsberry S, Chong HJ, Friedrich JB, Pham TN, Arbabi S, Carrougher GJ, Gibran NS. Explosion Injuries from E-Cigarettes. *N Engl J Med.* 2016 Oct 6;375(14):1400-1402. doi: 10.1056/NEJMc1608478.

Catala-Valentin A, Bernard JN, Caldwell M, Maxson J, Moore SD, Andl CD. E-Cigarette Aerosol Exposure Favors the Growth and Colonization of Oral *Streptococcus mutans* Compared to Commensal Streptococci. *Microbiol Spectr.* 2022 Apr 27;10(2):e0242121. doi: 10.1128/spectrum.02421-21.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. E-cigarette, or vaping, Products visual dictionary. [Internet]; 2023 [Acesso 17 set 2023]. Disponível em: https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/pdfs/ecigarette-or-vaping-products-visual-dictionary-508.pdf

Chaiben CL, Batista TBD, Penteado CAS, Barbosa MCM, Ventura TMO, Dionizio A, Rosa EAR, Buzalaf MAR, Azevedo-Alanis LR. Salivary proteome analysis of crack cocaine dependents. *Arch Oral Biol.* 2021 Jan;121:104952. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104952.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta.* 2007 Aug;383(1-2):30-40. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.011

Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol.* 2010 Jul;28(7):710-21. doi: 10.1038/nbt.1661.

Dutra LM, Glantz SA. Electronic cigarettes and conventional cigarette use among U.S. adolescents: a cross-sectional study. *JAMA Pediatr.* 2014 Jul;168(7):610-7. doi: 10.1001/jamapediatrics.2013.5488. Erratum in: *JAMA Pediatr.* 2014 Jul;168(7):684. PMID: 24604023; PMCID: PMC4142115.

Etter JF. Levels of saliva cotinine in electronic cigarette users. *Addiction.* 2014 May;109(5):825-9. doi: 10.1111/add.12475.

Famele M, Ferranti C, Abenavoli C, Palleschi L, Mancinelli R, Draisci R. The chemical components of electronic cigarette cartridges and refill fluids: review of analytical methods. *Nicotine Tob Res.* 2015 Mar;17(3):271-9. doi: 10.1093/ntr/ntu197.

Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res.* 2015 Feb;17(2):168-74. doi: 10.1093/ntr/ntu176.

Fonseca BM, Moreno IE, Magalhães AR, Barroso M, Queiroz JA, Ravara S, Calheiros J, Gallardo E. Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Mar 15;889-890:116-22. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.006.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.

Figueredo CA, Abdelhay N, Figueredo CM, Catunda R, Gibson MP. The impact of vaping on periodontitis: A systematic review. *Clin Exp Dent Res*. 2021 Jun;7(3):376-384. doi: 10.1002/cre2.360.

Figueiredo VC, Szklo AS, Costa LC, Kuschinir MCC, Silva NLT, Bloch CT, Szklo M. ERICA: Smoking prevalence in brazilian adolescents. *Rev. Saúde Pública*. 2016 Fev; 50:doi:10.1590/s01518-8787.201605000674

Füzéry AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin Proteomics*. 2013 Oct 2;10(1):13. doi: 10.1186/1559-0275-10-13.

Grana R, Benowitz N, Glantz SA. E-cigarettes: a scientific review. *Circulation*. 2014 May 13;129(19):1972-86. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667.

Goel R, Durand E, Trushin N, Prokopczyk B, Foulds J, Elias RJ, Richie JP Jr. Highly reactive free radicals in electronic cigarette aerosols. *Chem Res Toxicol*. 2015 Sep 21;28(9):1675-7. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00220.

Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Oct;12(5):483-90. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.024.

Harvanko AM, Havel CM, Jacob P, Benowitz NL. Characterization of Nicotine Salts in 23 Electronic Cigarette Refill Liquids. *Nicotine Tob Res*. 2020 Jun 12;22(7):1239-1243. doi: 10.1093/ntr/ntz232.

Harrison R, Hicklin D Jr. Electronic cigarette explosions involving the oral cavity. *J Am Dent Assoc*. 2016 Nov;147(11):891-896. doi: 10.1016/j.adaj.2016.03.018.

Hassona Y, Scully C. Salivary changes in oral mucosal diseases. *Periodontol 2000*. 2016 Feb;70(1):111-27. doi: 10.1111/prd.12102.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9. doi:10.1067/mpr.2001.113778.

Huang R, Li M, Gregory RL. Nicotine promotes *Streptococcus mutans* extracellular polysaccharide synthesis, cell aggregation and overall lactate dehydrogenase

activity. Arch Oral Biol. 2015 Aug;60(8):1083-90. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.04.011.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Cigarros eletrônicos: o que sabemos? Estudo sobre a composição do vapor e danos à saúde, o papel na redução de danos e no tratamento da dependência de nicotina. [Internet]; 2016 [Acesso 17 set 2023].

Disponível em:

https://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/cigarros_eletronicos.pdf

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Dados e números da prevalência do tabagismo. [Internet]; 2022b [Acesso em 17 set 2023]. Disponível em:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/dados-e-numeros-do-tabagismo/prevalencia-do-tabagismo#:~:text=Este%20inqu%C3%A9rito%20%C3%A9%20realizado%20nas,6%2C7%25%20entre%20mulheres.>

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Tabagismo [Internet]; 2022a. [Acesso em 18 set 2023]. Disponível em <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/tabagismo>.

International Agency for Research on Cancer – IARC. Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans [Internet], 2023. [Acesso 17 set 2023]. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>

Jacob N, Golmard JL, Berlin I. Relationships between nicotine and cotinine concentrations in maternal milk and saliva. Acta Paediatr. 2015 Aug;104(8):e360-6. doi: 10.1111/apa.13031.

Jun HK, Jung YJ, Ji S, An SJ, Choi BK. Caspase-4 activation by a bacterial surface protein is mediated by cathepsin G in human gingival fibroblasts. Cell Death Differ. 2018 Feb;25(2):380-391. doi: 10.1038/cdd.2017.167.

Kataoka H, Inoue R, Yagi K, Saito K. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2009 Jan 15;49(1):108-14. doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.044.

Kulyyassov A, Fresnais M, Longuespée R. Targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of proteins: Basic principles, applications, and perspectives. Proteomics. 2021 Dec;21(23-24):e2100153. doi: 10.1002/pmic.202100153.

Langman RE. The specificity of immunological reactions. Mol Immunol. 2000 Aug;37(10):555-61. doi: 10.1016/s0161-5890(00)00083-3.

Larance M, Lamond AI. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 May;16(5):269-80. doi: 10.1038/nrm3970.

Lerner CA, Sundar IK, Watson RM, Elder A, Jones R, Done D, Kurtzman R, Ossip DJ, Robinson R, McIntosh S, Rahman I. Environmental health hazards of e-cigarettes and their components: Oxidants and copper in e-cigarette aerosols. *Environ Pollut.* 2015 Mar;198:100-7. doi: 10.1016/j.envpol.2014.12.033.

Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol.* 2012 Jul;48(7):569-77. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.01.021.

Liu Y, Hüttenhain R, Collins B, Aebersold R. Mass spectrometric protein maps for biomarker discovery and clinical research. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013 Nov;13(8):811-25. doi: 10.1586/14737159.2013.845089.

Llena-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Aug;11(5):E449-55

Lomaestro BM, Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother.* 1995 Dec;29(12):1263-73. doi: 10.1177/106002809502901213.

Marynak KL, Gammon DG, Rogers T, Coats EM, Singh T, King BA. Sales of Nicotine-Containing Electronic Cigarette Products: United States, 2015. *Am J Public Health.* 2017 May;107(5):702-705. doi: 10.2105/AJPH.2017.303660.

Müller F, Naharro M, Carlsson GE. What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe? *Clin Oral Implants Res.* 2007 Jun;18 Suppl 3:2-14. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01459.x. Erratum in: *Clin Oral Implants Res.* 2008 Mar;19(3):326-8. PMID: 17594365.

Navazesh M, Kumar SK; University of Southern California School of Dentistry. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *J Am Dent Assoc.* 2008 May;139 Suppl:35S-40S. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0353.

Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1054-6. doi: 10.1038/4551054a.

Ooi BG, Dutta D, Kazipeta K, Chong NS. Influence of the E-Cigarette Emission Profile by the Ratio of Glycerol to Propylene Glycol in E-Liquid Composition. *ACS Omega.* 2019 Aug 5;4(8):13338-13348. doi: 10.1021/acsomega.9b01504.

Overbeek DL, Kass AP, Chiel LE, Boyer EW, Casey AMH. A review of toxic effects of electronic cigarettes/vaping in adolescents and young adults. *Crit Rev Toxicol.* 2020 Jul;50(6):531-538. doi: 10.1080/10408444.2020.1794443.L

Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil*. 2018 Sep;45(9):730-746. doi: 10.1111/joor.12664.

Pérez-Ortuño R, Martínez-Sánchez JM, Fernández E, Pascual JA. High-throughput wide dynamic range procedure for the simultaneous quantification of nicotine and cotinine in multiple biological matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2015 Nov;407(28):8463-73. doi: 10.1007/s00216-015-8993-7.

Rouabhia M, Semlali A. Electronic cigarette vapor increases *Streptococcus mutans* growth, adhesion, biofilm formation, and expression of the biofilm-associated genes. *Oral Dis*. 2021 Apr;27(3):639-647. doi: 10.1111/odi.13564.

Santos, G.S.C. Saliva: Identificação de variáveis fundamentais para a recolha de amostras de um biobanco. Dissertação – Mestrado. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Católica Portuguesa. Viseu, 2014.

Saurina J, Sentellas S. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolite profiling in the field of drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2019 May;14(5):469-483. doi: 10.1080/17460441.2019.1582638.

Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol*. 2009 Feb;3(1):33-44. doi: 10.1016/j.molonc.2008.12.001.

Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature10098.

Schwarzmeier LAT, Cruz BS, Ferreira CCP, Carvalho BFC, Alves MGO, Lima Carta CF, Issa JS, Almeida JD. E-cig might cause cell damage of oral mucosa. *Oral 13 Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*. v.131, n.4, p.435 - 443, 2021. Epub 2020 Nov 19. doi: 10.1016/j.oooo.2020.11.009.

Seitz CM, Kabir Z. Burn injuries caused by e-cigarette explosions: A systematic review of published cases. *Tob Prev Cessat*. 2018 Sep 10;4:32. doi: 10.18332/tpc/94664.

Sinha I, Goel R, Bitzer ZT, Trushin N, Liao J, Sinha R. Evaluating electronic cigarette cytotoxicity and inflammatory responses in vitro. *Tob Induc Dis*. 2022 May 10;20:45. doi: 10.18332/tid/147200.

Sinha I, Modesto J, Krebs NM, Stanley AE, Walter VA, Richie JP Jr, Muscat JE, Sinha R. Changes in salivary proteome before and after cigarette smoking in smokers compared to sham smoking in nonsmokers: A pilot study. *Tob Induc Dis*. 2021 Jun 29;19:56. doi: 10.18332/tid/138336.

St Helen G, Dempsey DA, Havel CM, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Impact of e-liquid flavors on nicotine intake and pharmacology of e-cigarettes. *Drug Alcohol Depend.* 2017 Sep 1;178:391-398. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.05.042.

St Helen G, Dempsey DA, Havel CM, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Impact of e-liquid flavors on nicotine intake and pharmacology of e-cigarettes. *Drug Alcohol Depend.* 2017 Sep 1;178:391-398. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2017.05.042.

Stragierowicz J, Mikołajewska K, Zawadzka-Stolarz M, Polańska K, Ligocka D. Estimation of cutoff values of cotinine in urine and saliva for pregnant women in Poland. *Biomed Res Int.* 2013;2013:386784. doi: 10.1155/2013/386784.

Travis N, Knoll M, Cook S, Oh H, Cadham CJ, Sánchez-Romero LM, Levy DT. Chemical profiles and toxicity of electronic cigarettes: an umbrella review and methodological considerations. *Int J Environ Res Public Health.* 2023 Jan 20;20(3):1908. doi: 10.3390/ijerph20031908.

Thomas SC, Xu F, Pushalkar S, Lin Z, Thakor N, Vardhan M, Flaminio Z, Khodadadi-Jamayran A, Vasconcelos R, Akapo A, Queiroz E, Bederoff M, Janal MN, Guo Y, Agualló D, Gordon T, Corby PM, Kamer AR, Li X, Saxena D. Electronic Cigarette Use Promotes a Unique Periodontal Microbiome. *mBio.* 2022 Feb 22;13(1):e0007522. doi: 10.1128/mbio.00075-22.

Vogel EA, Ramo DE, Rubinstein ML. Prevalence and correlates of adolescents' ecigarette use frequency and dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2018 Jul 1;188:109- 112. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.03.051

Washio J, Takahashi N. Metabolomic Studies of Oral Biofilm, Oral Cancer, and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 2;17(6):870. doi: 10.3390/ijms17060870.

Watson G, McIntosh S, Rahman I. Inflammatory biomarkers and growth factors in saliva and gingival crevicular fluid of e-cigarette users, cigarette smokers, and dual smokers: A pilot study. *J Periodontol.* 2020 Feb 12. doi: 10.1002/JPER.19-0457.

Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, Chen T, Su M, Zhao A, Jia W. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer.* 2011 Nov 1;129(9):2207-17.

Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PLoS One.* 2013;8(3):e57987. doi: 10.1371/journal.pone.0057987.

World Health Organization - WHO. CID-11: International classification of diseases 11th revision [Internet]; 2023b. [Acesso 17 set 2023]. Disponível em: <https://icd.who.int/browse11/lm/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f268445189>.

World Health Organization - WHO. Tobacco [Internet]; 2023a. [Acesso em 18 set 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>.

Yamazaki T, Aoki Y. Cathepsin G binds to human lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 1997 Jan;61(1):73-9. doi: 10.1002/jlb.61.1.73.

Yamazaki T, Aoki Y. Cathepsin G enhances human natural killer cytotoxicity. *Immunology*. 1998 Jan;93(1):115-21. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00397.x.

Zhang Q, Wen C. The risk profile of electronic nicotine delivery systems, compared to traditional cigarettes, on oral disease: a review. *Front Public Health*. 2023 May 15;11:1146949. doi: 10.3389/fpubh.2023.1146949.

Zuber P, Nakano MM, Kajfasz JK, Lemos JA. Disruption of the adh (Acetoin Dehydrogenase) Operon Has Wide-Ranging Effects on *Streptococcus mutans* Growth and Stress Response. *J Bacteriol*. 2022 Mar 15;204(3):e0057821. doi: 10.1128/jb.00578-21.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado Sr. (a) _____

Eu, JANETE DIAS ALMEIDA, Professora Titular da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do registro no Conselho Regional de Odontologia CROSP 40.530, telefone para contato 12-3947 9078, irei coordenar um projeto de pesquisa cujo título é “Efeito do cigarro eletrônico na saliva e no epitélio da mucosa bucal”. O projeto será desenvolvido pela pesquisadora, cirurgiã dentista, Bruna Fernandes do Carmo Carvalho, CROSP 112.231.

Justificativa

O uso do cigarro eletrônico (e-cig ou vapes) torna-se cada vez mais comum no Brasil. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos destes dispositivos eletrônicos na mucosa da boca e, qual é a real relação dos riscos e benefícios provenientes do seu uso.

Objetivos e Procedimentos

O objetivo desta pesquisa é analisar as possíveis alterações causadas pelo uso do cigarro eletrônico na mucosa da boca, a partir da análise de componentes da saliva e, avaliação da expressão de genes referentes à inflamação, senescência, maturação celular e metabolização de carcinógenos, a partir dos esfregaços.

Se você concordar em participar deste estudo, o procedimento de coleta será feito da seguinte forma: Primeiro, faremos perguntas gerais, a respeito de tratamento médico, hábitos de alimentação e higiene da boca, além de perguntas sobre a frequência de uso do cigarro eletrônico e consumo de bebidas alcoólicas. Segundo, faremos um exame clínico dentro e fora de sua boca. Em seguida, a coleta da saliva será feita em um frasco adequado, de maneira não estimulada. Já as células da língua, serão coletadas com uma escova (tipo “escova de dente”). Este material será encaminhado para processamento e análises em laboratório, no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

As informações obtidas serão analisadas sem que seu nome apareça e o Sr(a) tem o direito de ser informado sobre os resultados das pesquisas.

Desconforto, Riscos e Benefícios

Não haverá desconforto ou dor durante a coleta de células e saliva da boca. E os benefícios diretos de sua participação nesta pesquisa são preventivos em relação à saúde bucal e geral já que será submetido a exame clínico dentro e fora de sua boca. Além disso,

44 contribuirá para o avanço dos estudos relacionados à prevenção do desenvolvimento de câncer bucal.

Garantia de Esclarecimento, Liberdade de Recusa e garantia de Sigilo

Você terá todos os esclarecimentos necessários sobre qualquer aspecto da pesquisa. Você é livre para recusar-se de participar da pesquisa, retirar seu consentimento ou interromper a qualquer momento, sem prejuízos. Os pesquisadores irão tratar da sua identidade com sigilo. Os resultados serão enviados a você e permanecerão confidenciais. Seu nome não será citado.

Despesas e Compensação financeiras

A participação na pesquisa não acarreta custo para você e não há nenhuma compensação financeira.

Declaração do Participante

Eu _____ portador do RG _____ declaro que, a pesquisadora Bruna Fernandes do Carmo Carvalho, me convidou a participar dessa pesquisa, tendo me explicado detalhadamente a finalidade, e lido comigo este termo de consentimento. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Autorizo a utilização das informações que serão por mim fornecidas ao responder os questionamentos e dos resultados obtidos. Declaro conhecer o que será feito, que foi garantida a confidencialidade e o acesso permanente aos esclarecimentos, e que minha participação não implicará em nenhum custo. Poderei entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa, sempre que julgar necessário. Assim como também poderei entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, situado na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, São José dos Campos-SP, fone (012) 3947-9028, e-mail ceph@fosjc.unesp.br e comunicar-me com a Coordenadora Profa. Dra. DENISE NICODEMO. Sendo assim, ACEITO participar. Caso seja de minha vontade posso desistir a qualquer hora sem que haja nenhum prejuízo ao meu tratamento. Assino o presente documento em duas vias de igual modo, ficando uma em minha posse.

_____, ____ de _____ de ____.

_____ Nome	_____ Assinatura do participante	_____ Data
_____ Nome	_____ Assinatura do pesquisador	_____ Data

APÊNDICE B – Ficha clínica e AUDIT/Consumo de bebidas alcoólicas

Acesso: <https://forms.gle/DJUKMqJt8TPfjr5>

Seção 1 - Dados Pessoais:

E-mail: _____

Nome completo: _____

Gênero: _____

Cor da pele: _____

Idade: _____

Data de nascimento: _____

Contato (Telefone): _____

Escolaridade: _____

Profissão: _____

Seção 2 – Teste AUDIT

1. Com que frequência consome bebidas que contêm álcool?

- 0 = nunca
- 1 = uma vez por mês ou menos
- 2 = duas a quatro vezes por mês
- 3 = duas a três vezes por semanas
- 4 = quatro ou mais vezes por semana

2. Quando bebe, quantas bebidas contendo álcool consome num dia normal?

- 0 = uma ou duas
- 1 = três ou quatro
- 2 = cinco ou seis
- 3 = de sete a nove
- 4 = dez ou mais

3. Com que frequência consome seis bebidas ou mais numa única ocasião?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

4. Nos últimos 12 meses, com que frequência percebeu de que não conseguia parar de beber depois de começar?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

5. Nos últimos 12 meses, com que frequência não conseguiu cumprir as tarefas que habitualmente lhe exigem por ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

6. Nos últimos 12 meses, com que frequência precisou beber logo de manhã para "curar" uma ressaca?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

7. Nos últimos 12 meses, com que frequência teve sentimento de culpa ou de remorso por ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

8. Nos últimos 12 meses, com que frequência não se lembrou do que aconteceu na noite anterior por causa de ter bebido?

- 0 = nunca
- 1 = menos de uma vez por mês
- 2 = pelo menos uma vez por mês
- 3 = pelo menos uma vez por semana
- 4 = diariamente ou quase diariamente

9. Já alguma vez ficou ferido ou ficou alguém ferido por você ter bebido?

- 0 = não
- 1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
- 2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

10. Já alguma vez um familiar, amigo, médico ou profissional de saúde manifestou preocupação pelo seu consumo de álcool ou sugeriu que deixasse de beber?

- 0 = não
- 1 = sim, mas não nos últimos 12 meses
- 2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

Seção 3 – Consumo de bebidas alcóolicas e substâncias químicas

1. Que tipo de bebida alcóolica você consome normalmente?

- a) cerveja
- b) vinho
- c) cachaça
- d) Destilados (vodka, tequila, rum, whisky ou gim)

2. Quantas doses de bebida (copos) consome em um dia típico?

- a) 1 a 2
- b) 3 a 4
- c) 5 a 6
- d) 7 a 9
- e) 10 ou mais

3. Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas? Se sim, quais?

4. Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias? (Caso não consuma, responda: N/A).

5. Faz uso de algum medicamento? Se sim, quais?

6. Utiliza o vape/pod e bebida alcóolica simultaneamente?

- a) sim
- b) não
- c) às vezes

7. Quando bebe, você aumenta o uso do vape/pod?

- a) sim
- b) não
- c) às vezes

8. Se a resposta anterior foi sim, quanto a mais seria o aumento do consumo de vape/pod?

- a) 1 a 2 vezes
- b) 3 a 4 vezes
- c) 5 a 6 vezes
- d) 7 a 10 vezes
- e) mais do que 10 vezes

APÊNDICE C – Consumo de Cigarro Eletrônico (vape ou pod)

Acesso: <https://forms.gle/cUJn6u7bY6HrHmoB7>

1. Há quanto tempo faz uso de vape ou pod?
2. Caso seja ex fumante de cigarros industrializados, há quanto tempo deixou de fumar? Se não é ex fumante de cigarros, por favor, responda: NA.
3. Qual a sua frequência semanal de uso do vape/pod?
 - a) Todos os dias
 - b) 1 a 2 dias
 - c) 3 a 4 dias
 - d) NI
4. Em um dia típico de uso do vape/pod, com que frequência você o utiliza?
 - a) 1 a 2 vezes
 - b) 3 a 4 vezes
 - c) 5 a 6 vezes
 - d) 7 a 10 vezes
 - e) mais de 10 vezes
5. Quando utiliza o vape/pod, por quanto tempo o vaporiza?
 - a) aproximadamente 1 minuto
 - b) 1 a 2 minutos
 - c) 3 a 5 minutos
 - d) mais do que 5 minutos
6. Usa alguma essência/flavorizante em seu vape/pod? (Em caso afirmativo, indique o sabor e a marca que está utilizando neste momento)
7. Quanto de essência/flavorizante você usa por dia (em ml)?
8. Qual a concentração da nicotina (em mg) de sua essência/flavorizante?

ANEXO A – Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos (CEPH)

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Cigarro eletrônico: citodiagnóstico e análise do metaboloma e biofotônica salivar

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36911420.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.397.780

Apresentação do Projeto:

O projeto foi reformulado com as solicitações do parecerista e apresenta-se adequado.

Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho visa investigar o possível envolvimento entre o uso do e-cig e o desenvolvimento de alterações relacionadas à inflamação, queratinização, senescência, reparo de DNA e metabolização de carcinógenos, em mucosa bucal, por meio de estudo metabolômico, espectroscopia vibracional, citomorfológico e de expressão gênica, a partir de amostras de saliva e citologia esfoliativa da mucosa de vaporizadores de e-cig.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os procedimentos para coleta de células e saliva da boca não causam dor ou desconforto no momento, mas existe a possibilidade de pequena sensibilidade na borda da língua após a coleta da citologia esfoliativa. Em relação a confidencialidade das informações, os pesquisadores se comprometem a manter os dados armazenados em sigilo e segurança.

Benefícios: Os benefícios diretos de participação nesta pesquisa são preventivos em relação à saúde bucal e geral, já que todos os participantes serão submetidos a exame clínico dentro e fora de sua boca. Além disso, a participação nesta pesquisa

contribuirá para o avanço dos estudos relacionados ao entendimento dos efeitos do cigarro eletrônico sobre a mucosa da boca.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP**



Continuação do Parecer: 4.397.780

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trará contribuições importantes sobre o uso do e-cig.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram respondidas e o projeto bem como os documentos obrigatórios foram aprovados.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1606553.pdf	07/10/2020 10:10:16		Aceito
Outros	formulario_resp_pend_modificado.doc	07/10/2020 10:09:37	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoModificado.pdf	07/10/2020 10:08:02	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.pdf	07/10/2020 10:07:10	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	06/08/2020 17:02:51	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	05/08/2020 16:34:56	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de concordância	Cartas_de_anuencia.pdf	05/08/2020 15:13:20	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Auxilio2020.pdf	05/08/2020	JANETE DIAS	Aceito

Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000

UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA - CAMPUS DE
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS -
UNESP



Continuação do Parecer: 4.397.780

/ Brochura Investigador	Projeto_Auxilio2020.pdf	15:10:30	ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_auxilio2020.pdf	05/08/2020 15:09:16	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 13 de Novembro de 2020

Assinado por:

Maria Aparecida Neves Jardini
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br