



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

LÍGIA ÂNGELO TAVARES SCHWARZMEIER

**AVALIAÇÃO DE DANOS CITOTÓXICOS E CITOGENÉTICOS EM
FUMANTES DE CIGARROS INDUSTRIALIZADOS E
VAPORIZADORES DE CIGARROS ELETRÔNICOS**

2018

LÍGIA ÂNGELO TAVARES SCHWARZMEIER

**AVALIAÇÃO DE DANOS CITOTÓXICOS E CITOGENÉTICOS EM FUMANTES DE
CIGARROS INDUSTRIALIZADOS E VAPORIZADORES DE CIGARROS
ELETRÔNICOS**

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 BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Tit. Janete Dias Almeida
Coorientadora: Prof. Dra. Celina Faig Lima Carta

São José dos Campos
2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Schwarzmeier, Lígia Ângelo Tavares

Avaliação de danos citotóxicos e citogenéticos em fumantes de cigarros industrializados e vaporizadores de cigarros eletrônicos / Lígia Ângelo Tavares Schwarzmeier. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Janete Dias Almeida

Coorientadora: Celina Faig Lima Carta

1. Hábito de fumar. 2. Abandono do hábito de fumar. 3. Mucosa bucal. 4. Testes para micronúcleos. 5. Cigarros eletrônicos. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Carta, Celina Faig Lima, 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.

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. Adj. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Vinícius Coelho Carrard

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Campus de Porto Alegre

São José dos Campos, 28 de março de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho a DEUS que sempre está comigo em todas as situações.

AGRADECIMENTOS

O período de mestrado me trouxe muito amadurecimento e crescimento, não só profissionalmente, mas como pessoa também. Por isso, gostaria de lembrar das pessoas que contribuíram para que eu chegasse ao final do mestrado.

Primeiramente agradeço a DEUS, meu amor maior, que em todas as fases da minha vida esteve comigo, me ensinou a ser mais forte entre um milagre e outro, me direcionando em cada passo, e me livrando de todos os meus medos. Foi ELE quem me sustentou em todos os momentos também durante o mestrado. Não foram poucas as vezes em que as incertezas, medos ou angústias bateram durante o desenvolvimento do trabalho, mas cada vez que isso acontecia, sempre recebia uma palavra de conforto, força, e de que tudo daria certo no final. Mesmo muitas vezes quando eu não via mais uma forma das coisas darem certo, parava para orar e ELE me dizia coisas como: “Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for! (Josué 1:9)” ou “Estás em volta de mim, por todos os lados, e me proteges com o teu poder (Salmos 139:5)”. E era isso que me dava força para continuar e seguir firme. E de fato as coisas foram se ajeitando e o trabalho pôde ser realizado. Além disso, DEUS colocou pessoas incríveis no meu caminho, que também foram muito importantes para que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido Thomas, que está sempre comigo, cuida de mim, e não mede esforços para me ver feliz. Sempre foi meu grande parceiro, aquele com quem me sinto a vontade para desabafar, e falar sobre qualquer coisa. É meu apoio não só para a vida pessoal, mas também me apoia muito profissionalmente. Embora ele seja engenheiro, acho que ele sabe anatomia melhor do que eu, rs, pois sempre me ajudou a estudar, desde o primeiro ano da faculdade e sempre foi um grande incentivador da minha felicidade. No período do mestrado não foi diferente, me ajudou a fazer muitas tabelas e planilhas, além de me ajudar a treinar todas as minhas apresentações de casos clínicos, trabalhos e aulas, mesmo que eu precisasse repetir infinitas vezes, ele sempre

me escutava com paciência! Além disso, o período de mestrado coincidiu com dois eventos marcantes pra nós, que nos mudou de alguma forma. Um foi o nosso casamento, que foi um momento de muita alegria, e que nos uniu ainda mais. O outro foi o acidente do Thomas. Ele foi atropelado por um ônibus no meio do primeiro ano de mestrado, e ficou hospitalizado por um pouco mais de 2 meses. E é interessante pensar que muitos momentos marcantes do período de hospital, coincidiram com momentos marcantes do mestrado. Como o dia do acidente ter sido no mesmo dia em que me reuni com a Profa. Janete e Celina para decidirmos meu novo projeto de pesquisa; ou um dos dias mais difíceis do hospital, quando retiraram o curativo do enxerto, foi o dia em que aprendi a técnica para coloração de Feulgen; e o dia da alta dele, foi quando voltei do congresso na UEL, e recebemos uma premiação pelo painel apresentado... Então, quando paro para lembrar de tudo isso, me sinto feliz e agradecida, pois com o cuidado de DEUS e apoio de todos, conseguimos superar tudo!!

Agradeço aos meus pais, Marcos e Kátia, que sempre me incentivaram a estudar e buscar meus sonhos. Meus maiores exemplos de relacionamento com DEUS, integridade e sabedoria, que sempre têm um bom conselho para dar e que sempre oram por mim. Obrigada por todo apoio e sustento durante toda a minha vida, sei que muitas vezes abriram mão das coisas deles para dar o melhor para os meus irmãos e para mim.

E falando de irmãos, também agradeço à Raquel e ao Otávio, que sempre me animam e me incentivam a persistir. Minha irmã sempre parecendo durona, mas que por dentro tem um coração enorme. Aquela irmã mais velha em quem a gente se espelha de alguma forma. Também o caçulinha da família, meu irmão, que sempre demonstra o quanto quer cuidar de todos, mesmo sendo o mais novo. Muitas vezes não precisamos falar nada, mas já sabemos quando não está tudo bem. Parceria que desenvolvemos desde que me conheço por gente, e aqueles que sei que posso contar em qualquer situação.

Aos meus avós Antônio, Francisca, Sérgio (em memória) e Ilka que sempre demonstraram muito carinho, amor, e sinto o quanto eles se alegram com as minhas conquistas. Dizem que os avós são pais duas vezes, e eu acredito nisso. Sei o quanto eles sofrem quando sofremos, e o quanto se alegram, quando nos alegramos. E se hoje tenho pais maravilhosos e íntegros,

sei que teve muito sacrifício e empenho por parte dos meus avós.

À família do meu marido Klaus, Jane, Viktor, Lukas, Juliana e Arthur (meu sobrinho lindo), que também me acompanharam nesse período, me acolheram muitas vezes e oraram por mim.

Sou grata a Professora Janete que me acolheu desde os ambulatórios de propedêutica na graduação. Ela é aquela professora tranquila, que nunca se desespera. Aquela que percebe quando estamos com os olhos cheios de lágrimas e nos abraça. Aquela que exerce bem pesquisa, ensino e extensão, tudo ao mesmo tempo. Obrigada por sempre tentar nos compreender e se esforçar para que o percurso do trabalho seja mais leve.

Agradeço também à minha coorientadora Celina, que me mostrou os primeiros micronúcleos e que me ensinou cada passo da metodologia desse trabalho. Uma profissional de muita competência, que também me permitiu conhecer o seu bom coração. Ela sempre esteve disponível para me ensinar e ajudar em tudo, inclusive nos dias mais improváveis. Obrigada por me ensinar tanto!

Também à Mônica, sempre muito animada, empenhada e que me ajudou nas coletas, e com a ajuda dela conseguimos a maioria dos pacientes do grupo de cigarro eletrônico. Uma excelente profissional que cativa à todos por onde passa.

À Bruna, que participou ativamente das coletas dos pacientes fumantes e ex-fumantes, e que é uma pessoa muito querida, que conheci a pouco tempo, mas que já tenho muito carinho.

Não posso deixar de agradecer às alunas de Iniciação Científica Beatriz e Camila, pois estiveram comigo nas coletas, dedicando o tempo delas para me ajudar. Também à Gabriela Lima, que me acompanhou nas primeiras colorações de Feulgen.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora que tão prontamente aceitaram participar desse momento tão importante para mim.

Agradeço também ao Professor Ivan, que me mostrou os passos para a estatística do trabalho.

À Dra Jaqueline que disponibilizou espaço para que realizássemos as coletas, e por nos indicar os pacientes tratados no Incor para participarem da pesquisa. E também à Aline, secretária da seção de tabagismo do Incor, que nos auxiliou com os agendamentos das coletas.

À empresa PTS Diagnostics (Indianapolis, USA) que nos forneceu o aparelho PTS Detect™ Cotinine System® utilizado no nosso trabalho.

Agradeço também aos técnicos de laboratório Walter e Ana Lourdes, que muitas vezes me ajudaram com materiais e esclarecimento de dúvidas referentes à coloração de Feulgen.

Ao Carlos Guedes, que sempre nos ajuda com submissões para agências de fomento e dúvidas sobre o comitê de ética. E à Carla, secretária do departamento, que sempre nos oferece suporte.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, que me acolheu desde a graduação e forneceu toda a infra-estrutura para minha pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal que me aceitou e me deu muitas oportunidades. E aos Docentes que fazem parte da pós-graduação, com os quais eu tive a oportunidade de aprender tanto. Agradeço por cada ensinamento e levarei comigo as qualidades de bons professores de cada um.

Aos meus amigos da pós-graduação, que foram essenciais nessa caminhada, em cada conversa, café e aprendizados. Vocês fizeram com que essa jornada fosse mais leve. A Fernanda e a Camila, foram as primeiras que me aproximei, e desde então essa amizade só cresce! Meu amigo Colombiano, Cristhian, que também entrou comigo no mestrado e é um exemplo de dedicação. O Vitor, Noala e Vivian foram aqueles que mais me ajudaram a entender as lâminas de Patologia, e foi assim que nossa amizade começou! A Elis, aquela que me identifiquei com a personalidade, e que sempre nos dizia que no fim tudo daria certo. A Jaqueline, Felipe, Renata e Bruna, que nos aproximamos depois, mas que também são muito queridos e especiais, sempre dispostos a ajudar.

Aos pacientes que aceitaram participar da pesquisa. Não foi fácil conseguir a maioria deles, mas agradeço por acreditarem no meu trabalho. Sei que as pessoas que fazem uso do cigarro eletrônico procuram uma forma de melhorar qualidade de vida, tanto deles mesmos, como das famílias que com eles convivem. E tenho muito respeito por todos, e por isso busquei fazer um trabalho com imparcialidade, e espero que este estudo possa trazer algum benefício para essas pessoas, que são os maiores envolvidos.

E por fim, aprendi com esse trabalho que precisamos ser fortes e buscar dar o nosso melhor em tudo o que fazemos. Nem sempre agradaremos a todos, mas o

nosso papel é exercer nosso trabalho com responsabilidade, honestidade e imparcialidade, visando sempre o bem das pessoas e confiando em DEUS de que tudo dará certo!

"Se eu voar para o Oriente ou for viver nos lugares mais distantes do Ocidente,
ainda ali Tua mão me guia, ainda ali Tu me ajudas." Salmo 39:9-10.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivo específico.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Seleção das amostras	21
3.2 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico	22
3.3 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras	24
3.4 Processamento laboratorial	24
3.5 Investigação de MN e anomalias metanucleares.....	24
3.6 Análise estatística	25
4 RESULTADO	26
4.1 Perfil das amostras.....	26
4.2 Comparações e Correlações entre E-cig, Ex-fumante e Controle.....	28
4.2.1 Avaliação de MN e anomalias metanucleares.....	32
4.2.2 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis quantitativas	35
4.2.3 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis qualitativas ..	42
4.3 Comparações e Correlações entre Fumante, Ex-fumante e Controle.....	47
4.3.1 Avaliação de MN e anomalias metanucleares.....	49
4.3.2 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis quantitativas	51
4.3.3 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis qualitativas	54
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE	78
ANEXOS	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CO	Monóxido de Carbono
E-cig	Cigarro eletrônico
ECSI	Escore de Consumo Situacional Issa
MN	Micronúcleo
OMS	Organização Mundial da Saúde
TFDC	Teste de Fagerström para Dependência à Cigarro

Schwarzmeier LÂT. Avaliação de danos citotóxicos e citogenéticos em fumantes de cigarros industrializados e vaporizadores de cigarros eletrônicos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi investigar a frequência de micronúcleos e anomalias metanucleares na mucosa bucal de vaporizadores de cigarro eletrônico e de fumantes de cigarro industrializado, e comparar com ex-fumantes e não fumantes para determinar se existe diferença no dano citogenético e citotóxico, bem como se o dano diminui após a cessação tabágica. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: Controle; E-cig; Fumante e Ex-fumante. Os critérios de inclusão adotados foram: ausência de histórico de neoplasia maligna bucal e ausência de quaisquer sinais clínicos visíveis de alteração no local avaliado. Foi realizada avaliação quanto ao grau de dependência nicotínica, por meio do Teste de Fagerström para Dependência à Cigarro e Escore de Consumo Situacional Issa, e quanto ao perfil tabágico dos pacientes. A mensuração de CO expirado foi utilizada como critério objetivo de avaliação de consumo de tabaco, bem como a concentração de cotinina no sangue capilar dos pacientes avaliados. As amostras foram coletadas por meio de citologia esfoliativa da região de bordo lateral de língua e soalho bucal. Os esfregaços obtidos foram fixados com spray alcoólico e as lâminas coradas pelo método de Feulgen. Posteriormente, foi realizada a investigação dos micronúcleos e das anomalias metanucleares. Para a comparação dos dados não paramétricos foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Já para as correlações e associações entre os dados, foram utilizados o teste da correlação de Spearman e o Teste Exato de Fisher, respectivamente. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes. A partir dos resultados, observou-se diferença significativa entre os grupos E-cig e Controle ($p=0,0072$), e também entre os grupos Fumante e Controle ($p=0,0004$), no total de MN. Em contrapartida os grupos E-cig e Ex-fumante foram semelhantes, enquanto que o grupo Fumante foi significativamente maior que o grupo Ex-fumante ($p=0,0370$) também no total de MN. Também foi possível observar diferença significativa entre os grupos E-cig e Ex-fumante, bem como entre os grupos E-cig e Controle em todas as anomalias metanucleares, exceto cariorrexe. Os grupos Fumante e Ex-fumante foram diferentes em cariorrexe ($p=0,0517$), e *nuclear bud* ($p=0,0470$) apenas, e o grupo Fumante foi significativamente maior que o grupo Controle em todas as anomalias metanucleares. A comparação entre os grupos E-cig e Fumante não foi realizada, devido à ingestão de altas doses de bebidas alcoólicas no grupo E-cig. O tabagismo promove danos citotóxicos e citogenéticos e o uso de E-cig associado ao álcool parece causar genotoxicidade e citotoxicidade. A cessação tabágica promove reversibilidade dos danos causados anteriormente.

Palavras-chave: Hábito de fumar. Abandono do hábito de fumar. Mucosa bucal. Testes para micronúcleos. Tabagismo. Cigarros eletrônicos.

Schwarzmeier LÂT. *Evaluation of cytotoxic and cytogenetic damages in smokers of industrialized cigarettes and vaporizers of electronic cigarettes [dissertation].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the frequency of micronuclei and metanuclear anomalies in the oral mucosa of electronic cigarette vaporizers and smokers of industrialized cigarettes and to compare with former smokers and nonsmokers to determine if there is a difference in cytogenetic and cytotoxic damage, as well as if it decreases after smoking cessation. The patients were divided into 4 groups: Control; E-cig; Smoker; and Former smoker. The inclusion criteria adopted were: absence of a history of oral malignancy and absence of any visible clinical signs of alteration at the evaluated site. An assessment was made of the degree of nicotinic dependence, using the Fagerström Test for Cigarette Dependence and the Issa Situational Consumption Score, and of the smoking profile of the patients. Measurement of expired CO was used as the objective criterion for the evaluation of tobacco consumption as well as the concentration of cotinine in the capillary blood of the evaluated patients. The samples were collected from the tongue lateral region and floor of the mouth by means of exfoliative cytology. The smears obtained were fixed with alcoholic spray and the slides were stained by the Feulgen method. Subsequently, the investigation of the micronuclei (MN) and metanuclear anomalies was carried out. For the non-parametric data, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were performed. For the correlations and associations between the data, the Spearman correlation test and the Fisher Exact Test were respectively used. A significance level of 5% was adopted for all tests. From the results, we observed a significant difference between groups E-cig and Control ($p = 0.0072$), and also between groups Smoker and Control ($p = 0.0004$), in the total of MN. In contrast, groups E-cig and Former smoker were similar, whereas the group of Smoker was significantly higher than Former smoker ($p = 0.0370$) also in the total of MN. It was also possible to observe a significant difference between E-cig and Former smoker, as well as between E-cig and Control in all metanuclear anomalies, except for karyorrhexis. Already Smoker and Former smoker, they were different in karyorrhexis ($p = 0.0517$), and nuclear bud ($p = 0.0470$) only, and Smoker was significantly higher than Control in all metanuclear abnormalities. The comparison between groups E-cig and Smoker could not be performed due to the ingestion of high doses of alcoholic beverages in E-cig group. Smoking promotes cytotoxic and cytogenetic damage and the use of alcohol-associated electronic cigarettes appears to cause genotoxicity and cytotoxicity. Smoking cessation promotes reversibility of previously caused harm.

Keywords: Smoking. Smoking Cessation. Mouth mucosa. Micronucleus tests. Tobacco. Electronic cigarettes.

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo representa a epidemia que mais ameaça a saúde pública mundial e é responsável por mais de 7 milhões de mortes por ano, sendo que cerca de 890 mil dessas mortes são causadas pela exposição involuntária ao fumo (World Health Organization, 2017). Além disso, é considerado um fator de risco evitável de câncer, doenças cardiovasculares e respiratórias (Instituto Nacional de Câncer, 2016). Estima-se que um paciente tabagista vive 10 anos a menos, que um paciente não tabagista (Instituto Nacional de Câncer, 2016).

A farmacologia e processos comportamentais que causam a dependência do tabaco pela nicotina ocorrem de maneira similar à dependência de drogas como cocaína e heroína (U.S. Department of Health & Human Services, 1988; Hatsukami et al., 2008). A dependência nicotínica acontece devido a vários fatores como a velocidade e quantidade de entrega de nicotina, por sua depuração e efeito sobre o cérebro, pela dependência física que causa, e além disso o tabagista irá desenvolver uma associação entre o ato de fumar com os estímulos provenientes do uso de tabaco (Zevin et al., 1998; Benowitz, 1999; Stratton et al., 2001; Hatsukami et al., 2008).

A nicotina possui meia-vida plasmática relativamente curta, de 1 a 2 horas. O processo de metabolização da nicotina gera cotinina e outros subprodutos (Benowitz et al., 2009; Kaisar et al., 2017). A cotinina representa cerca de 75% dos subprodutos provenientes da nicotina, possui uma meia-vida plasmática mais longa, de 16 a 18 horas, e aparece em maiores concentrações no sangue do que a nicotina (Benowitz et al., 2009). Devido a isso, a cotinina é considerada um biomarcador da ingestão de nicotina (Benowitz et al., 2009; Kaisar et al., 2017). A mensuração tanto da nicotina, quanto da cotinina podem ser realizadas a partir de amostras de sangue, urina, saliva e cabelo (Benowitz et al., 2009).

O consumo de tabaco é a causa de diversas desordens no organismo (Instituto Nacional de Câncer, 2008; Daijo et al., 2016). É também um importante fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas em boca, e também está associado às desordens com potencial de transformação maligna (Warnakulasuriya et al., 2016; Narayan, Shilpashree, 2016). Entre as neoplasias

malignas que acometem a mucosa de revestimento da cavidade bucal, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o mais frequente e corresponde a mais de 90% dos casos (Mao et al., 2004; Scully, Felix, 2006; Siebers et al., 2013; Santos-Silva et al., 2014).

O consumo de tabaco pode ser feito de diferentes formas como tabaco mascado, fumo de rolo ou palha, cigarro industrializado e, nos últimos anos surgiu o uso do cigarro eletrônico (E-cig) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014). O E-cig foi desenvolvido pelo farmacêutico Hon Lik em 2003, cujo objetivo era favorecer a cessação do tabagismo (Cahn, Siegel, 2011; Knorst et al., 2014; Famele et al., 2015). O E-cig é constituído por: uma bateria, um cartucho que disponibiliza o líquido a ser vaporizado e um atomizador. Este sistema eletrônico simula o cigarro industrializado, uma vez que pode promover a vaporização da nicotina (Knorst et al., 2014). É importante ressaltar que a concentração de nicotina presente nos líquidos destes dispositivos é variada e o consumidor escolhe a concentração desejada, podendo optar por cartuchos sem nicotina. Também estão presentes na maioria dos líquidos de E-cig o propileno glicol e a glicerina vegetal, que servem como umectantes e auxiliam na produção de fumaça (Famele et al., 2015; Chun et al., 2017). Além dessas principais substâncias, existem as essências aromatizantes, utilizadas para promover sabores mais agradáveis, existindo no mercado mais de 7700 tipos de sabores, todavia a pureza dos ingredientes utilizados é questionada na literatura quanto à segurança e também à veracidade dos ingredientes informados pelos fabricantes (Zhu et al., 2014; Javed et al., 2017).

O suposto atrativo estaria na tecnologia que permite ao usuário fumar “sem riscos” pela ausência da queima do tabaco, impedindo assim a liberação de muitas substâncias químicas produzidas pela combustão normal com o uso do tabaco convencional (Famele et al., 2015). Desta forma, os fumantes poderiam conviver de maneira “segura” com os não fumantes em um mesmo ambiente que estaria livre da poluição produzida pelo tabaco (Grana et al., 2014; Famele et al., 2015). Além disso, por haver menor número de componentes nestes líquidos, comparado com os cigarros industrializados, estudos mostram que o E-cig produz menos substâncias tóxicas (Goniewicz et al., 2014; Shahab et al., 2017). Devido a isso, alguns acreditam que os E-cig possam ser menos nocivos que o cigarro industrializado, o que seria interessante para aqueles pacientes que não desejam parar com o hábito

de fumar, mas que desejam diminuir os riscos (Goniewicz et al., 2014). Entretanto, não existem estudos suficientes que comprovem a segurança e eficácia deste dispositivo (Grana et al., 2014; Famele et al., 2015). As altas concentrações de nicotina bem como as elevadas temperaturas atingidas por estes dispositivos pode ser motivo de preocupação. Isto porque embora existam menos compostos nos E-cig, o aquecimento do líquido para transformação em aerossol gera reações químicas que podem promover a formação de outras substâncias prejudiciais, como formaldeído, acetaldeído e acroleína (Goniewicz et al., 2014; Famele et al. 2015; Javed et al., 2017; Chun et al., 2017).

Outrossim, acredita-se que o E-cig pode favorecer a dependência à nicotina, por ter alguns componentes atrativos, como sabores acrescentados e a apresentação com formato de objetos (semelhante a uma caneta, por exemplo), tornando-o mais discreto e aceitável (Knorst et al., 2014). Entretanto, alguns estudos evidenciaram que alguns aditivos de sabor podem conter compostos que causam danos à saúde, como por exemplo, o diacetil que é utilizado para dar sabor amanteigado, em alimentos, e que foi encontrado em alguns líquidos de E-cig, o qual está associado na literatura como causador de distúrbios respiratórios (Kreiss et al., 2002; Gerloff et al., 2017; Chun et al., 2017).

A importação, comercialização e propaganda do E-cig não é permitida no Brasil, porém, isto não impede a aquisição destes através de compras pela internet ou no exterior onde a venda e consumo são permitidos (Knorst et al., 2014).

Os efeitos do E-cig na mucosa bucal ainda não estão bem descritos na literatura disponível. Quanto aos cigarros industrializados, já foi demonstrado que são agentes genotóxicos para mucosa bucal associados ou não a outros carcinógenos (Lima et al., 2010; Oliveira et al., 2012). No entanto, ainda não está estabelecida a reversibilidade destes danos. Quando as células são expostas a agentes genotóxicos, podem ocorrer aberrações cromossômicas. Estas podem ser consideradas biomarcadores, que por definição são estruturas que podem ser mensuradas no organismo, capazes de influenciar ou até mesmo prever a incidência de uma doença (World Health Organization, 2001).

Um dos biomarcadores para avaliação de alterações cromossômicas causadas por agentes genotóxicos é a presença de micronúcleos (MN). Durante a divisão celular, na transição das fases de metáfase e anáfase, pode haver a

separação de um pequeno fragmento de núcleo, que se apresenta como uma estrutura arredondada ao lado do núcleo principal, e a isto denomina-se MN. Acredita-se que agentes carcinógenos causem esse tipo de alteração precoce, antes que ocorram alterações histopatológicas e clínicas, principalmente em mucosa bucal (Carvalho et al., 2002; Freitas et al., 2003; Çelik et al., 2003; Holland et al., 2008; Lima et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Dosi et al., 2016). Estudos têm evidenciado a relação entre o tabagismo e a presença de MN, que por sua vez parece estar associado ao processo de carcinogênese (Stich et al., 1982; Roberts, 1997; Bloching et al., 2000; Dietz et al., 2000; Oliveira et al., 2012; Kumar et al., 2016).

Além da formação de MN, outras alterações nucleares podem ser formadas e avaliadas em decorrência de aberrações cromossômicas, sendo denominadas anomalias metanucleares. Estas anomalias também podem ser indicativas de citotoxicidade e genotoxicidade. São consideradas anomalias metanucleares: cariólise, cariorrexe, binucleação, *broken eggs* e *nuclear bud*. Elas podem ocorrer devido a lesão e morte celular, além de defeitos durante a divisão das células (Roberts, 1997; Oliveira et al., 2012; Kumar et al., 2016).

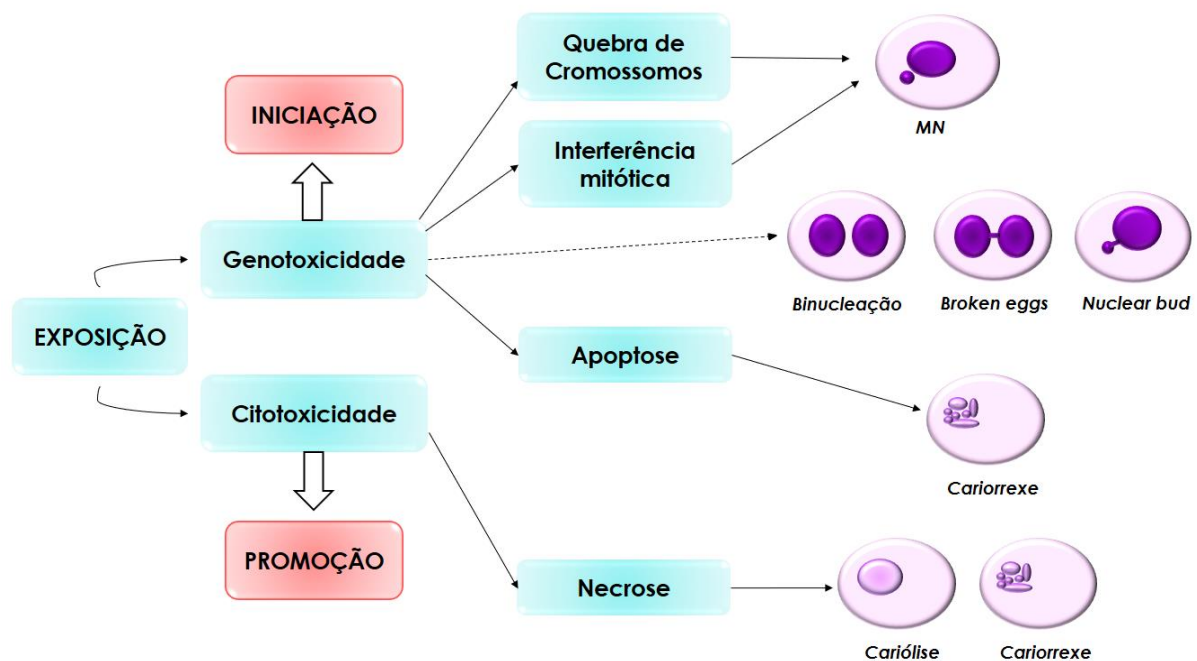
A cariólise caracteriza-se pela dissolução nuclear sendo observada pela falta de coloração do núcleo celular, como uma resposta a lesões celulares que ocorrem frequentemente em células do epitélio não queratinizado. Já a cariorrexe é a desintegração do núcleo que causa a formação de pequenos fragmentos deste material nuclear durante o processo de necrose e apoptose. A binucleação celular é a formação de dois núcleos em uma mesma célula, que ocorre durante o processo de diferenciação. O termo *broken egg* é designado para caracterizar um núcleo dividido, cujas partes são ligadas por uma banda de material Feulgen-negativo (Tolbert et al., 1992). E por fim, o termo *nuclear bud* é utilizado para definir estruturas que causam a expulsão do conteúdo de DNA indesejado, durante a divisão celular, e alguns autores acreditam que podem ser precursores de MN (Dutra et al., 2010).

Para Tolbert et al. (1992), a carcinogênese está relacionada à citotoxicidade por meio da proliferação celular, sendo os agentes citotóxicos promotores da carcinogênese. Enquanto que a genotoxicidade está mais relacionada à indução da apoptose, promovendo a iniciação da carcinogênese. Em relação aos MN e às anomalias metanucleares, Tolbert et al. (1992) consideram MN, binucleação, *broken*

egg e cariorrexe indicadores de genotoxicidade; cariólise e cariorrexe de citotoxicidade.

A binucleação trata-se de uma alteração provocada por interferências durante a divisão celular. Os *nuclear buds* quando descritos pelos autores, tinham origem incerta e eram denominados de *Broken eggs*, porém atualmente, parecem ser formados devido à expulsão do DNA amplificado do núcleo principal (Dutra et al., 2010). A cariólise está associada à resposta adaptativa frente a lesões celulares e pode ser reflexo de danos grosseiros à célula levando à morte celular por necrose. O mesmo é observado na cariorrexe, porém, neste tipo de anomalia pode ser observada morte celular em estágios mais iniciais caracterizada por apoptose. A radiação ionizante e substâncias químicas se relacionam com o DNA das células, podendo estimular apoptose. A apoptose em níveis normais pode exercer proteção por eliminar células com alterações genéticas, porém em excesso é um importante indicador de agressão genotóxica.

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos danos celulares provenientes da exposição à agentes genotóxicos e citotóxicos



Fonte: Adaptado de Tolbert et al. (1992).

Diante do exposto, torna-se oportuno realizar a investigação de MN e anomalias metanucleares na mucosa bucal de vaporizadores de E-cig e fumantes de cigarro industrializado e comparar com ex-fumantes e não fumantes para tentar estabelecer assim os danos citogenéticos e citotóxicos causados por diferentes formas de consumo de tabaco e ainda investigar se estas alterações são reversíveis após a cessação tabágica.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência de MN e de anomalias metanucleares encontrados em células esfoliadas da mucosa bucal de vaporizadores de E-cig e de fumantes de cigarro industrializado, e comparar com ex-fumantes e não fumantes para determinar se existe diferença no dano citogenético e citotóxico, bem como se este dano diminui após a cessação tabágica.

2.2 Objetivo específico

Correlacionar a frequência de MN e de anomalias metanucleares com dados relacionados ao consumo de tabaco, sendo considerados e avaliados: avaliação da dependência nicotínica (Teste de Fagerström para Dependência à Cigarro e Escore de Consumo Situacional Issa), a quantificação da carga tabágica e análise do perfil tabágico (perguntas referentes ao consumo de tabaco, mensuração de monóxido de carbono expirado e concentração de cotinina no sangue).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das amostras

Os critérios de inclusão adotados foram: ausência de histórico de neoplasia maligna bucal e ausência de quaisquer sinais clínicos visíveis de alteração no local avaliado. Os critérios de não inclusão são: consumo de outras formas de tabaco (fumo de rolo, cigarro de palha, charuto e cachimbo), tratamento oncológico prévio quer seja cirúrgico, radio e/ou quimioterapia em qualquer órgão ou sistema, alteração de mucosa de revestimento bucal.

Os grupos foram formados da seguinte forma:

- a) Grupo Controle: composto por 30 pacientes consecutivos, não fumantes e não vaporizadores, em atendimento no ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), UNESP, São José dos Campos, São Paulo;
- b) Grupo E-cig: 22 vaporizadores de cigarro eletrônico, há pelo menos 6 meses, provenientes de convites em redes sociais;
- c) Grupo Fumante: 30 pacientes fumantes de cigarro industrializado em atendimento no Programa Ambulatorial de Tratamento do Tabagismo do Instituto do Coração (Incor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), coordenado pela Dra Jaqueline Scholz;
- d) Grupo Ex-fumante: 30 pacientes em tratamento para tabagismo com abstinência há no mínimo 01 ano e máximo 02 anos, em atendimento no Programa Ambulatorial de Tratamento do Tabagismo do Instituto do Coração (Incor), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), coordenado pela Dra Jaqueline Scholz.

Após serem esclarecidos sobre a proposição e condições deste trabalho, aqueles que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento

Livre e Esclarecido (TCLE) em duas vias. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICT-UNESP sob o protocolo nº 1.033.312/2015 PH/CEP (ANEXO A).

Todos os participantes foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal e responderam a um questionário sob forma de entrevista, onde foram indagados sobre frequência e quantidade consumida de cigarros. Os dados obtidos foram anotados em uma ficha de coleta (APÊNDICE A).

3.2 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico

A avaliação da dependência nicotínica foi realizada através do Teste de Fagerström para Dependência à Cigarro (TFDC) (Heatherton et al., 1991; Fagerström, 2012) que é composto por seis questões que são pontuadas de acordo com a resposta. De acordo com a pontuação obtida, os participantes foram alocados em cinco categorias em relação à dependência nicotínica: muito baixa (0 a 2 pontos), baixa (3 a 4 pontos), moderada (5 pontos), elevada (6 a 7 pontos) e muito elevada (8 a 10 pontos) (ANEXO B). Esta análise foi realizada somente para os grupos Fumante e Ex-fumante. Este teste foi aplicado para o grupo E-cig, porém, foi inviabilizado, visto que uma das perguntas do TFDC visa a quantificação de cigarros consumidos por dia e tal quantificação não pode ser feita para E-cig. O teste não foi realizado para o grupo Controle, uma vez que estes indivíduos nunca fizeram uso de cigarro.

Ainda para a avaliação da dependência nicotínica foi aplicado o Escore de Consumo Situacional Issa (ECSI) (Issa, 2012) aos participantes dos grupos E-cig e Ex-fumante, que é constituído por quatro questões cujas respostas geram uma pontuação entre 0 a 4. A cada resposta assinalada como “sim” acrescenta-se 1 ponto, e o grau de dependência nicotínica foi determinado da seguinte forma: baixa (até 1 ponto), moderada (2-3 pontos) e alta (4 pontos) (ANEXO C). A avaliação ECSI pode ser utilizada para o grupo E-cig, pois contém perguntas relacionadas ao hábito e não quantifica o número de cigarros/dia.

A quantificação da carga tabágica foi feita com o cálculo de maços-ano

(pack-years) que é o número de cigarros fumados por dia, dividido por vinte e multiplicado pelo número de anos que o indivíduo fumou (Reichert et al., 2008).

Na análise do perfil tabágico foram incluídas perguntas referentes ao consumo atual do cigarro, idade de início, tipo, quantidade e tempo de uso, carga tabágica, número de tentativas anteriores e auxílio medicamentoso para a cessação.

A avaliação do consumo de cigarros, para os grupos E-cig, Fumante e Ex-fumante, foi complementada com a concentração do monóxido de carbono (CO) do ar expirado, por meio do equipamento piCO + Smokerlyzer® (Bedfont Scientific Ltd, UK). Os indivíduos considerados em abstinência apresentaram concentração de CO < 6 partes por milhão (ppm), conforme os parâmetros fornecidos pelo fabricante (Smokerlyzer, 2017).

O aparelho PTS Detect™ Cotinine System® (PTS Diagnostics, Indianapolis, USA) foi utilizado para avaliação da concentração de cotinina no sangue capilar dos indivíduos do grupo E-cig, para teste objetivo do consumo de nicotina. Considerando que a comercialização do E-cig não é legalizada, a real concentração nicotínica indicada pelo fabricante do produto pode não ser fidedigna por não haver a fiscalização devida. A avaliação será feita por meio de sangue obtido por punção capilar (ponta de dedo), semelhante ao que é feito em avaliação de glicemia capilar (Dextro). O sangue será coletado e inserido no aparelho que mensura a concentração de cotinina, a qual é classificada pelo fabricante da seguinte forma: não tabagistas (<25 ng/mL), possível exposição passiva (25-40 ng/mL), consumo leve de tabaco (41-199 ng/mL, de 1 a 9 cigarros/dia), consumo pesado de tabaco (>200 ng/mL, mais de 10 cigarros/dia). A avaliação pelo aparelho PTS Detect™ Cotinine System® foi realizada apenas para os indivíduos do grupo E-cig, pois a quantidade concedida pela empresa era suficiente apenas para mensuração neste grupo. Tal mensuração é de suma importância, considerando ser um critério objetivo para quantificar a cotinina decorrente do consumo de nicotina pelos vaporizadores. Outrossim, foi importante para estabelecer uma equivalência entre a concentração de nicotina presente nos E-cigs em relação aos cigarros industrializados.

3.3 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras

A citologia esfoliativa foi realizada utilizando o *cytobrush* na coleta de material da borda lateral da língua e soalho bucal, sem utilização prévia de enxaguatórios bucais (Fontes et al., 2008). Os esfregaços obtidos foram fixados com spray alcoólico. As amostras citológicas devidamente identificadas foram encaminhadas para processamento no laboratório de Histotécnica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do ICT - UNESP.

3.4 Processamento laboratorial

As amostras citológicas foram coradas por meio da técnica da coloração de Feulgen, da seguinte forma: após fixação inicial as lâminas foram lavadas em álcool 95% e então transferidas diretamente para o ácido clorídrico (HCL) 5N a temperatura ambiente, durante 5 min. O material foi transferido e incubado no reagente de Schiff por 90 min a temperatura de 4°C.

Em seguida, foram realizadas três lavagens consecutivas em água destilada. Após imersão, foram lavadas três vezes com álcool absoluto. As lâminas foram clarificadas com xilol e sua montagem realizada com Entellan® (Merck, Germany) e lamínula.

3.5 Investigação de MN e anomalias metanucleares

As lâminas foram examinadas, sob microscopia de luz, utilizando o microscópio óptico, inicialmente com aumento 400x e para confirmação dos MN aumento 1000x, para garantir que não há ligação entre o núcleo principal e o MN. Foram analisadas aproximadamente 1500 células de cada indivíduo que apresentavam o núcleo cor magenta.

A contagem de MN incluiu somente as células com os núcleos intactos, com perímetro nuclear liso e distinto, e que apresentem citoplasma definido. Para contagem de MN, o critério utilizado é a presença de um halo homogêneo circundante, representativo de uma membrana, menos de 1/3 do diâmetro do núcleo associado, intensidade da coloração com Feulgen semelhante ao núcleo e mesmo plano focal à microscopia (Tolbert et al., 1992; Bolognesi et al., 2013) e que não tenham nenhuma ligação com o núcleo. Foi verificada a presença de 1 MN, mais de 1 MN em uma mesma célula (> 1 MN), total de células micronucleadas e total de MN em todos os casos.

Adicionalmente é realizada avaliação de anomalias metanucleares por meio da quantificação de: cariólise, em que apresenta-se como uma dissolução do núcleo; cariorrexe, representado pela fragmentação do núcleo; binucleação, onde a célula aparece com dois núcleos, no mesmo plano focal; *nuclear bud*, como um núcleo principal e a presença de um lóbulo que representa entre 1/3 e 1/4 do núcleo principal, unidos por um filamento nucleoplasmático; e broken eggs, sendo a mesma categoria de *nuclear bud*, porém com o lóbulo em tamanhos maiores, semelhante ao tamanho do núcleo principal (Oliveira et al., 2012; Dutra et al., 2010).

3.6 Análise estatística

Para a comparação dos dados referentes à frequência de MN e anomalias metanucleares entre os grupos, foi efetuada análise exploratória dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis e inferencial não paramétrico. E para comparação dos dados sobre dependência do consumo de cigarros, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, também não paramétrico. Para correlação entre o consumo de tabaco e a frequência de MN e anomalias metanucleares, a análise exploratória dos dados foi realizada por meio do teste de Correlação de Spearman. E por fim, para a análise das associações do uso de álcool, sexo e localização das amostras com a frequência de MN e anomalias metanucleares, foi aplicado o Teste Exato de Fisher. Foi utilizado o *software Graph Pad Prism 7* e adotado um nível de significância de 5% para todos os testes.

4 RESULTADO

Os resultados serão exibidos segundo: 4.1 Perfil das amostras; 4.2 Comparações e Correlações entre os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle; 4.3 e Correlações entre Fumante, Ex-fumante e Controle.

4.1 Perfil das amostras

Foram coletadas amostras citológicas de 22 indivíduos para o grupo E-cig e 30 pacientes para os demais grupos. As informações referentes à sexo e idade dos participantes podem ser observadas na Tabela 1 e as informações do grau de escolaridade estão indicados na Tabela 2.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos por sexo e média de idade dos indivíduos que compõem os grupos Controle, E-cig, Fumante e Ex-fumante

	Controle	E-cig	Fumante	Ex-fumante
Homens	14	15	14	17
Mulheres	16	7	16	13
Idade	*55,80 ± 12,55 [30 - 80]	*41,5 ± 11,46 [23 - 60]	*51,96 ± 9,72 [29 - 70]	*58,36 ± 9,15 [43 - 73]

Legenda: *Média ± desvio padrão [idade mínima - idade máxima].

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 – Distribuição dos grupos Controle, E-cig, Fumante e Ex-fumante quanto ao grau de escolaridade em porcentagem

Escolaridade	Controle		E-cig		Fumante		Ex-fumante	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Nenhum	0	0%	0	0%	1	3%	1	3%
1º grau	4	13%	1	5%	5	17%	17	57%
2º grau	15	50%	4	18%	10	33%	6	20%
Ensino superior	4	13%	15	68%	7	23%	6	20%
Sem informação	7	23%	2	9%	7	23%	0	0%

Legenda: N° é o número de indivíduos que possuem o determinado grau de escolaridade e % é referente porcentagem.

Fonte: Elaborada pela autora.

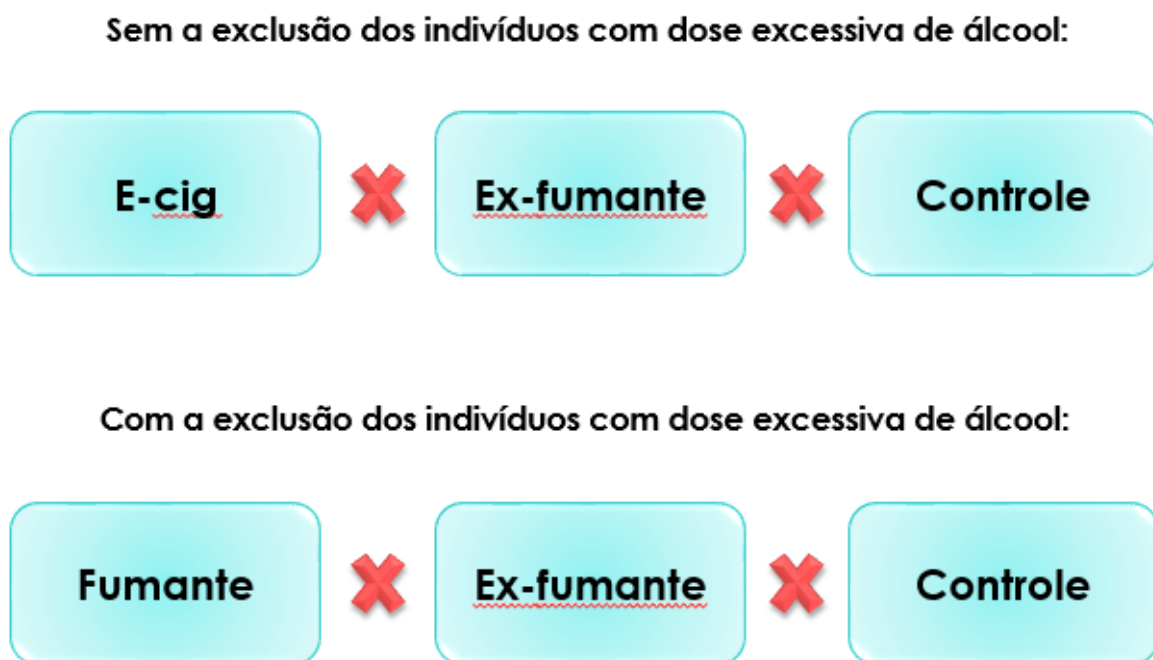
No grupo Controle a maioria dos indivíduos tinham 2º grau (completo ou não), já no grupo E-cig a maioria dos indivíduos possuíam ensino superior (completo ou não), com a maior quantidade de pessoas com ensino superior dentre todos os grupos. No grupo Fumante a maioria dos indivíduos tinha 2º grau (completo ou não), seguido por ensino superior (completo ou não), enquanto que o grupo Ex-fumante a maioria dos indivíduos tinham 1º grau (completo ou não).

Inicialmente, um dos critérios de inclusão foi de ingestão máxima de 3 doses de bebidas alcoólicas por semana (equivalendo à 12 doses semanais), de acordo com o estabelecido por Lima et al. (2010). Uma vez que o uso de álcool mesmo que com pouca frequência é bastante comum na população, essa quantidade foi estabelecida para diferenciar os indivíduos em relação ao consumo de álcool para incorporar no trabalho apenas indivíduos que não fizessem uso de álcool ou pelo menos que fizessem um uso mínimo. Entretanto, não foi possível excluir do grupo E-cig os pacientes que excediam a referida dose de bebida alcoólica, visto que a maioria dos indivíduos participantes da pesquisa, faz uso de altas quantidades de álcool. Sendo assim, a análise comparativa do grupo E-cig foi realizada separadamente à análise do grupo Fumante, pois entendemos que seria uma comparação desproporcional, devido aos diferentes estímulos de bebida alcoólica

entre os grupos E-cig e Fumante.

As comparações serão realizadas da seguinte forma: grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, e posteriormente grupos Fumante, Ex-fumante e Controle, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Comparações realizadas entre os grupos, levando em consideração a exclusão de indivíduos que fazem uso de mais de 3 doses semanais



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Comparações e Correlações entre E-cig, Ex-fumante e Controle

A organização dos grupos que serão comparados inicialmente nos itens de 4.2.1 a 4.2.6 está demonstrada na Figura 3.

Figura 3 – Divisão dos grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, indivíduos excluídos e N para análise estatística



Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo E-cig de 19 participantes, 18 haviam sido fumantes do cigarro industrializado antes do uso de E-cig. As informações relacionadas ao consumo de tabaco dos grupos E-cig (antes do uso de E-cig) e Ex-fumante (antes da cessação do tabagismo), como número de cigarros consumidos por dia, tempo de tabagismo anterior, concentração de CO (ppm) expirado, ECSI e concentração de cotinina capilar, podem ser observadas na Tabela 3. A comparação entre os dados de consumo de tabaco nos grupos E-cig e Ex-fumante foi realizada pelo teste de Mann Whitney ($\alpha=5\%$).

Tabela 3 – Dados da média de consumo de tabaco e nível de dependência nos grupos E-cig e Ex-fumante

	E-cig	Ex-fumante	p-valor
Nº Cigarros/dia	24,56 ± 14,89 [21]	18,81 ± 10,62 [20]	0,1065
Tempo de tabagismo anterior (anos)	22,78 ± 13,55 [20]	39,96 ± 12,32 [40]	0,0002
Carga tabágica	31,13 ± 25,78 [28,5]	38,37 ± 26,28 [30,6]	0,3079
CO (ppm)	4,78 ± 3,59 [4]	1,63 ± 0,74 [1]	<0,0001
ECSI	2,05 ± 1,18 [2]	3 ± 0,83 [3]	0,0050

Legenda: Teste de Mann Whitney ($\alpha=5\%$). Média ± desvio padrão [mediana]. Significância em **negrito** ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se diferença estatística entre os grupos E-cig e Ex-fumante no tempo de tabagismo anterior ao consumo de E-cig para o grupo E-cig e à cessação tabágica para o grupo Ex-fumante. Na análise do tempo de tabagismo anterior, os indivíduos do grupo Ex-fumante fumaram por mais tempo que os indivíduos do grupo E-cig. Também houve diferença estatística entre os grupos E-cig e Ex-fumante no ECSI, demonstrando que o grupo Ex-fumante foi mais dependente à nicotina, em comparação ao grupo E-cig.

A avaliação do CO expirado foi realizada no momento da coleta. Já na análise do CO expirado, os indivíduos do grupo Ex-fumante apresentaram menores concentrações expiradas em comparação ao grupo E-cig. A avaliação da concentração de cotinina pelo aparelho PTS Detect™ Cotinine System® está representada na Tabela 4. Em 8 casos, não foi possível quantificar a concentração de cotinina no sangue.

Tabela 4 – Distribuição dos indivíduos do grupo E-cig quanto a utilização de E-cig com ou sem nicotina e a quantificação indicada pelo aparelho PTS Detect™ Cotinine System®

Escala PTS	Nº indivíduos	[] Nicotina no E-cig	Frequência (mL/dia)
< 25 ng/ml	2	0 e 18 mg	5 ml/dia
25 – 40 ng/ml	1	6 mg	?
41 – 99 ng/ml	1	1,2 mg	12 ml/dia
> 200 ng/ml	7	2 e 4 mg	5, 10 e 30 ml/dia

Legenda: A Escala PTS está de acordo com o indicado pelo fabricante; [] Nicotina no E-cig é referente à concentração de nicotina contida no cartucho do E-cig; Frequência (mL/dia) corresponde ao quanto os indivíduos consomem em mL dos líquidos contidos no carthucho por dia; ? representa o indivíduo que não soube quantificar a frequência diária em ml/dia.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foi aplicado o teste de correlação de Spearman, com significância de 5%, para avaliar a correlação entre a concentração de cotinina no sangue mensurada por meio do aparelho PTS Detect™ Cotinine System®, e a frequência diária em ml/dia de E-cig (Corr = 0,218; $p = 0,5189$), bem como a concentração de nicotina adicionada no cartucho dos E-cig (Corr = - 0,016; $p = 0,9626$). Não foi encontrada diferença em nenhuma das correlações.

Em relação ao tempo de uso de E-cig, variou entre 5 meses e 96 meses (8 anos), representando uma média de $33,1 \pm 28,7$ [24] (média $\pm$ desvio padrão [mediana]).

No grupo E-cig, 2 indivíduos relataram fazer uso esporádico de substâncias ilícitas (uma ou menos de uma vez por mês) e 2 relataram já ter feito uso anteriormente.

Em relação ao consumo de álcool no grupo E-cig 15 indivíduos faziam uso de bebidas alcoólicas, sendo que 9 excediam o consumo mínimo de álcool considerado neste trabalho (3 doses semanais ou 12 mensais). Em relação aos tipos de bebida consumida pelos vaporizadores a bebida que os indivíduos mais relataram consumir foi a cerveja, seguida por vinho, whisky, vodka, caipirinha, batida, tequila e champagne.

Em relação ao consumo de álcool no grupo Ex-fumante 8 indivíduos faziam uso de álcool, sendo que 6 excediam o consumo mínimo de álcool considerado neste trabalho. A maioria dos participantes faziam uso de cerveja, seguido de vinho e vodka.

Enquanto que no grupo Controle 8 indivíduos faziam uso de bebidas alcoólicas, sendo que 2 excediam o consumo mínimo de álcool considerado neste trabalho. A bebida bebida mais consumida pelos indivíduos foi o vinho, seguido por cerveja.

4.2.1 Avaliação de MN e anomalias metanucleares

Para contagem de MN e avaliação das anomalias metanucleares (cariólise, cariorrexe, *binucleação*, *broken egg* e *nuclear bud*) foram considerados 19 casos do grupo E-cig, 27 casos do grupo Ex-fumante e 30 casos do grupo Controle. Sendo que em relação à localização intra-bucal, foram escolhidos os dois locais de maior incidência de câncer bucal (língua e soalho) e as lâminas avaliadas foram escolhidas de acordo com a celularidade e distribuição celular (Queiroz et al., 2010). Portanto, foram avaliados no grupo E-cig 9 lâminas com amostras provenientes de língua e 10 de soalho bucal, em Ex-fumante 12 de língua e 15 de soalho bucal, e no Controle 15 de língua e 15 de soalho bucal.

Os resultados da comparação da frequência de MN entre os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, através do teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$), podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação entre a frequência de MN nos grupos Controle, E-cig e Ex-fumante

	Controle	E-cig	Ex-fumante	p-valor
01 MN	1,33 ± 2,41 [0]	2,74 ± 2,71 [2]	2,19 ± 2,56 [2]	0,0144
> 01 MN	0 ± 0 [0]	0,11 ± 0,32 [0]	0,04 ± 0,19 [0]	0,1863
Total de células micronucleadas	1,33 ± 2,41 [0]	2,84 ± 2,87 [2]	2,22 ± 2,65 [2]	0,0112
Total de MN	1,33 ± 2,41 [0]	2,95 ± 3,06 [3]	2,26 ± 2,75 [2]	0,0091

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). Média $\pm$ desvio padrão [mediana]. Significância de p-valor **em negrito** ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Houve diferença entre os grupos em 1MN, total de células micronucleadas e total de MN.

Ainda para avaliar a diferença entre os grupos, em relação à frequência de MN foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle. A partir deste teste, diferença estatística nas análises de frequência de MN, apenas entre os grupos E-cig e Controle, em 1MN ($p = 0,0124$), total de células micronucleadas ($p = 0,0093$) e total de MN ($p = 0,0072$).

Os resultados da comparação das anomalias metanucleares entre os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$), pode ser observado na Tabela 6, da mesma forma como foi realizado para frequência de MN.

Tabela 6 – Distribuição da frequência de anomalias metanucleares entre os grupos Controle, E-cig e Ex-fumante

	Controle	E-cig	Ex-fumante	p-valor
Cariólise	14,5 ± 31,13 [6]	51,79 ± 63,85 [28]	21,63 ± 32,23 [7]	0,0007
Cariorrexe	0,8 ± 1,38 [0]	1,632 ± 1,74 [1]	1,519 ± 2,23 [0]	0,1056
Binucleação	2,27 ± 2,39 [1,5]	9,95 ± 7,05 [9]	3,963 ± 3,75 [4]	<0,0001
<i>Broken egg</i>	0,47 ± 0,73 [0]	3,74 ± 2,85 [3]	0,89 ± 1,55 [0]	<0,0001
<i>Nuclear bud</i>	0,67 ± 0,99 [0]	3,63 ± 1,80 [4]	0,81 ± 1,27 [0]	<0,0001

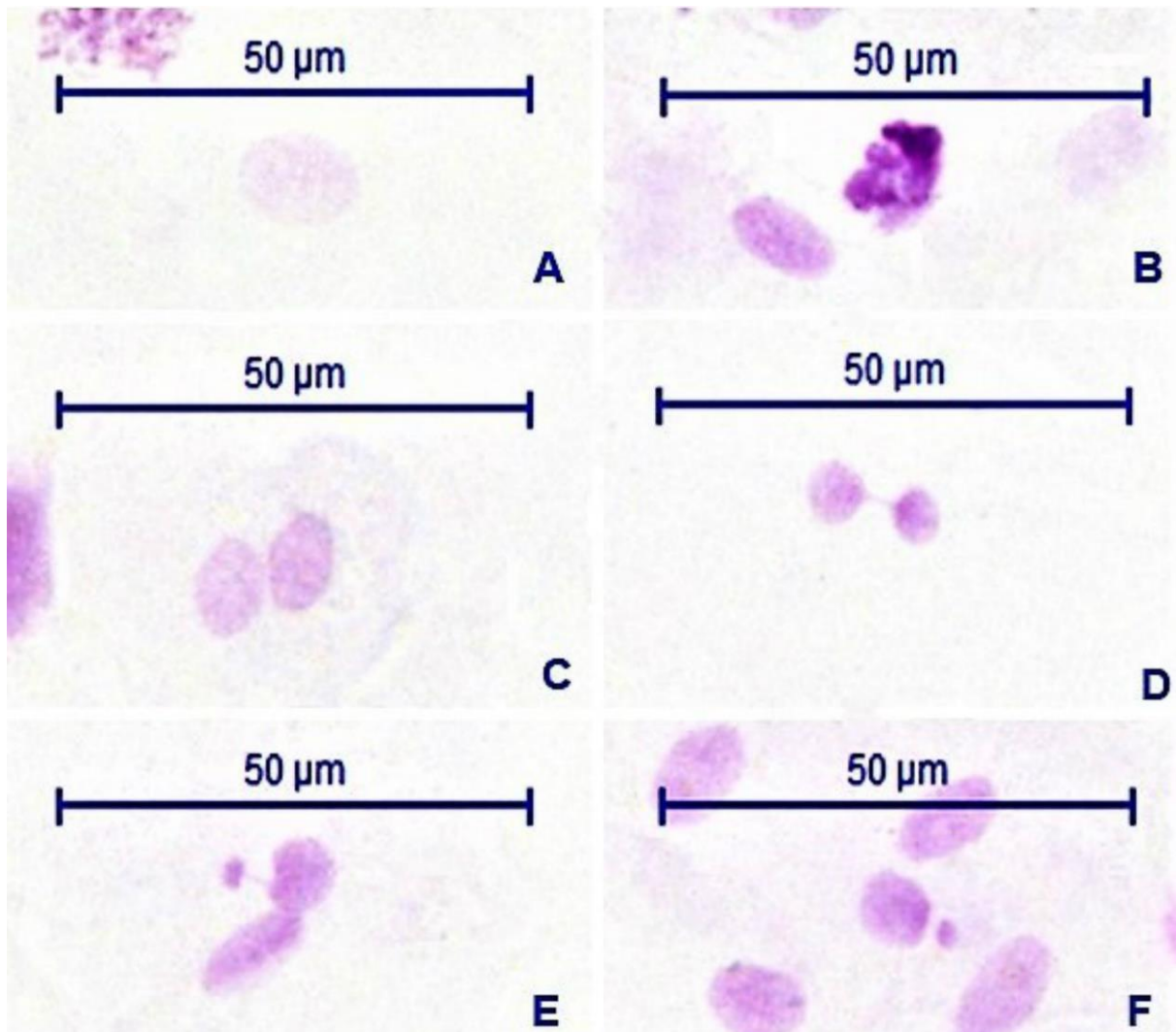
Legenda: Teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). Média ± desvio padrão [mediana]. Significância de p valor em **negrito** ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observou-se diferença estatística entre os grupos 3, apenas na avaliação de cariólise, binucleação, *broken egg* e *nuclear bud*, sendo que no grupo E-cig houve maior quantidade, seguido pelos grupos Ex-fumante e Controle.

Ainda para avaliar a diferença entre os grupos, em relação à frequência de MN foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle. De acordo com este teste, observou-se diferença significativa entre os grupos E-cig e Ex-fumante em cariólise ($p = 0,0094$), binucleação ($p = 0,0044$), *broken egg* ($p = <0,0001$) e *nuclear bud* ($p = <0,0001$). E entre os grupos E-cig e Controle também observou-se diferença na avaliação de cariólise ($p = 0,0007$), binucleação ($p = <0,0001$), *broken egg* ($p = <0,0001$) e *nuclear bud* ($p = <0,0001$), exceto na avaliação de cariorrexe, cuja diferença entre os grupos não foi observada.

Figura 4 – Células da mucosa bucal exibindo anomalias metanucleares e MN



Legenda: Coloração de Feulgen. a) Cariólise; b) Cariorrexe; c) Binucleação; d) *Broken egg*; e) *Nuclear bud*; f) Micronúcleo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis quantitativas

O grau de correlação entre duas variáveis foi observado por meio da correlação de Spearman.

Através deste teste, a frequência de MN no grupo E-cig, foi correlacionada com as variáveis quantitativas: número de cigarros por dia, tempo de uso do cigarro industrializado e carga tabágica, tempo de uso do E-cig, frequência de uso do E-cig

(ml/dia), concentração de nicotina no líquido do E-cig, concentração de CO expirado (piCO + Smokerlyzer®), ECSI e concentração de cotinina no sangue. Os dados quantificados de número de cigarros por dia, tempo de uso do cigarro industrializado e de carga tabágica foram avaliados somente para aqueles participantes que antes de vaporizar, faziam uso do cigarro industrializado. O TFDC, foi aplicado para os vaporizadores de E-cig, porém não foi possível calcular a dependência por meio deste teste, uma vez que uma das perguntas faz relação com a quantidade de cigarros fumados por dia, e para esses dispositivos não é possível quantificar dessa forma. Sendo assim, foi utilizado o ECSI.

Um indivíduo foi excluído dessas análises de correlações, devido à falta de informações necessárias sobre a carga tabágica anterior. Não foi possível a mensuração da concentração de cotinina capilar de todos os participantes, uma vez que em alguns casos o aparelho indicou quantidade insuficiente de sangue, e em um caso o paciente não aceitou realizar o teste. Portanto, apenas para a análise estatística da concentração de cotinina no sangue, os 7 casos em que não foram quantificados, foram excluídos, considerando apenas os 11 casos em que foi possível quantificar. Nos casos em que foi possível a mensuração, adotou-se 24 ng/ml para quando o aparelho PTS Detect™ Cotinine System® exibiu < 25ng/ml e 201 ng/ml para quando o aparelho exibiu > 200ng/ml, as demais concentrações (entre o intervalo de 25 à 200 ng/ml) foram utilizadas com o número exato exibido pelo aparelho. Na análise da frequência de uso do E-cig, 3 indivíduos não sabiam quantificar o uso em ml/dia, por isso, foi considerado uma dose mínima, de 1 ml/dia para estes participantes.

Os resultados destas análises configuram a matriz de correlação, que pode ser observada na Tabela 7, para o grupo E-cig.

Tabela 7 – Matriz de correlação entre a frequência de MN e demais variáveis referentes ao grupo E-cig

		1 MN	> 1 MN	Total de células micronucleadas	Total de MN
Nº cigarros/dia	r	0,194	0,310	0,194	0,194
	p-valor	0,440	0,209	0,440	0,440
Tempo de Tabagismo (anos)	r	0,060	0,210	0,060	0,060
	p-valor	0,811	0,401	0,811	0,811
Carga tabágica anterior	r	0,198	0,350	0,198	0,198
	p-valor	0,429	0,153	0,429	0,429
Tempo de uso E-cig (meses)	r	0,363	0,352	0,363	0,363
	p-valor	0,138	0,151	0,138	0,138
Uso de E-cig (ml/dia)	r	- 0,539	-0,306	-0,539	-0,539
	p-valor	* 0,020	0,215	* 0,020	* 0,020
[] de cotinina (mg)	r	0,351	0,217	0,351	0,351
	p-valor	0,152	0,385	0,152	0,152
CO (ppm)	r	-0,373	-0,284	-0,373	-0,373
	p-valor	0,126	0,252	0,126	0,126
ECSI	r	0,295	0,024	0,295	0,295
	p-valor	0,234	0,924	0,234	0,234
Concentração de cotinina (ng/ml)	r	0,0481	0,232	0,0481	0,0481
	p-valor	0,885	1	0,885	0,885

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor (P < 0.05).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos no grupo E-cig, demonstram que houve significância nas correlações da frequência do uso de E-cig por dia com 1 MN, total de células

micronucleadas e total de MN, sendo todas negativas, ou seja, inversamente proporcionais.

A frequência de MN do grupo Ex-fumante foi correlacionada com as seguintes variáveis quantitativas: número de cigarros por dia, tempo de uso do cigarro industrializado e carga tabágica, concentração de CO expirado (piCO + Smokerlyzer®) e TFDC. As informações dessas análises são referentes à época em que os indivíduos consumiam cigarro industrializado, ou seja abstinência de no mínimo 01 ano e máximo 02 anos. Apenas a avaliação de concentração de CO expirado foi realizada no momento da coleta, como critério objetivo de cessação. Os resultados dessa análise estão contidos na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz de correlação entre a frequência de MN e variáveis de consumo de tabaco do grupo Ex-fumante

		1 MN	> 1 MN	Total de células micronucleadas	Total de MN
Nº cigarros/dia	r	-0,133	0,229	-0,131	-0,131
	p-valor	0,507	0,250	0,513	0,513
Tempo de Tabagismo (anos)	r	-0,064	0,025	-0,064	-0,064
	p-valor	0,750	0,900	0,748	0,748
Carga tabágica anterior	r	-0,091	0,226	-0,089	-0,089
	p-valor	0,651	0,255	0,656	0,656
CO (ppm)	r	-0,057	0,138	-0,053	-0,053
	p-valor	0,777	0,489	0,792	0,792
TFDC	r	-0,414	-0,165	-0,418	-0,418
	p-valor	* 0,031	0,409	* 0,029	* 0,029
ECSI	r	- 0,072	0,240	-0,072	-0,072
	p-valor	0,719	0,228	0,719	0,719

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p (P < 0.05).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o grupo Ex-fumante, evidenciou-se correlação significativa apenas na variável do TFDC correlacionada à frequência de 1MN, total de células micronucleadas e total de MN, sendo todas negativas, ou seja, inversamente proporcionais.

Não foi realizado esta correlação para o grupo Controle, uma vez que por ser o grupo Controle, os indivíduos nunca fizeram uso de nenhum tipo de cigarro, não obtendo assim informações de carga tabágica, e dependência nicotínica.

Para as correlações das anomalias metanucleares, foram realizados os mesmos testes utilizados para correlação da frequência de MN. Foi utilizado o teste de correlação de Spearman, adotando significância de 5% para p-valor. Os resultados dessas correlações estão demonstrados na Tabela 9 e 10 para os grupos E-cig e Ex-fumante, respectivamente.

Tabela 9 – Matriz de correlação entre a anomalias metanucleares e variáveis de consumo de tabaco do grupo E-cig

(continua)

		Cariólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
Nº cigarros/dia	r	0,343	-0,109	-0,100	0,194	0,108
	p-valor	0,163	0,666	0,691	0,440	0,667
Tempo de Tabagismo (anos)	r	0,308	0,196	0,137	0,053	0,543
	p-valor	0,213	0,434	0,586	0,831	* 0,019
Carga tabágica anterior	r	0,392	0,046	0,122	0,226	0,415
	p-valor	0,107	0,855	0,629	0,365	0,086
Tempo de uso E-cig (meses)	r	0,131	-0,049	0,365	0,256	0,066
	p-valor	0,602	0,844	0,136	0,303	0,793
Uso de E-cig (ml/dia)	r	0,372	-0,274	-0,052	-0,364	-0,033
	p-valor	0,128	0,270	0,835	0,136	0,893

Tabela 9 – Matriz de correlação entre a anomalias metanucleares e variáveis de consumo de tabaco do grupo E-cig

(conclusão)

		Cariólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
[] de nicotina (mg)	r	-0,019	-0,185	0,026	-0,319	0,044
	p-valor	0,939	0,461	0,915	0,196	0,861
CO (ppm)	r	0,422	0,508	0,552	-0,196	-0,129
	p-valor	0,080	* 0,031	* 0,017	0,433	0,609
ECSI	r	0,186	-0,092	0,005	-0,142	-0,217
	p-valor	0,459	0,715	0,981	-0,217	0,385
Concentração de cotinina (ng/ml)	r	0,639	0,258	0,0397	-0,002	0,530
	p-valor	* 0,039	0,442	0,905	1	0,100

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A correlação foi significativa, no grupo E-cig, entre a concentração de CO expirado correlacionado à cariorrexe e binucleação; entre tempo de tabagismo (antes do uso de E-cig) e *nuclear bud*; e entre a concentração de cotinina capilar e cariólise; sendo todas correlações positivas, ou seja, diretamente proporcionais.

Tabela 10 – Matriz de correlação entre as anomalias metanucleares e demais variáveis referentes ao grupo Ex-fumante

(continua)

		Carióliólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
Nº	r	0,468	0,023	0,123	0,293	0,129
cigarros/dia	p-valor	* 0,013	0,905	0,539	0,137	0,520

Tabela 10 – Matriz de correlação entre as anomalias metanucleares e demais variáveis referentes ao grupo Ex-fumante

(conclusão)

		Cariólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
Tempo de Tabagismo (anos)	r	0,361	0,051	0,145	-0,015	0,102
	p-valor	0,063	0,799	0,467	0,939	0,611
Carga tabágica anterior	r	0,565	0,081	0,217	0,284	0,199
	p-valor	* 0,002	0,687	0,276	0,150	0,318
CO (ppm)	r	0,245	-0,209	-0,050	-0,056	-0,078
	p-valor	0,216	0,294	0,801	0,779	0,698
TFDC	r	0,021	-0,220	-0,117	-0,421	-0,392
	p-valor	0,915	0,269	0,560	* 0,028	* 0,043
ECSI	r	-0,389	-0,224	-0,032	-0,121	-0,312
	p-valor	*0,045	0,261	0,872	0,545	0,112

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor (P < 0.05).

Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo Ex-fumante, a correlação foi significativa e inversamente proporcional no TFDC com *broken egg* e *nuclear bud*, bem como entre ECSI e cariólise; e diretamente proporcional no número de cigarros fumados por dia (antes da cessação do tabagismo, ou seja, no mínimo 01 ano e máximo 02 anos) e carga tabágica anterior com a presença de cariólise.

A correlação para o grupo Controle não foi realizada para avaliação de anomalias metanucleares, pelo mesmo motivo que não foi feita para a frequência de MN.

4.2.3 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis qualitativas

Para esta análise foi realizada a avaliação de associação entre as variáveis de sexo, localização intra-bucal das amostras, uso de álcool e consumo de mais de 3 doses semanais de bebidas alcoólicas, com os dados de frequência de MN pelo teste Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Os resultados obtidos, podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Avaliação da associação da frequência de MN dos grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, e as variáveis sexo, localização e consumo de álcool com a frequência de 1 MN, Total de células micronucleadas e Total de MN

(continua)

Grupo	Variáveis		1 MN		p-valor	Total de Células Micron.		p-valor	Total MN		p-valor
			F	M		F	M		F	M	
E-cig	Sexo	≤	2	7	0,619	2	7	0,619	2	7	0,619
		>	4	5		4	5		4	5	
	Local	≤	3	6	0,346	3	6	0,346	3	6	0,346
		>	6	3		6	3		6	3	
	Uso de álcool	≤	2	7	>	2	7	>	2	7	>
		>	2	7		2	7		2	7	
	> 3 doses semanais	≤	4	5	0,637	4	5	0,637	4	5	0,637
		>	6	3		6	3		6	3	
	Sexo	≤	8	10	0,692	8	9	0,447	8	9	0,447
		>	3	6		3	7		3	7	
Ex-fumante	Local	≤	9	9	0,682	9	8	0,424	9	8	0,424
		>	3	6		3	7		3	7	

Tabela 11 – Avaliação da associação da frequência de MN dos grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, e as variáveis sexo, localização e consumo de álcool com a frequência de 1 MN, Total de células micronucleadas e Total de MN

(conclusão)

Grupo	Variáveis		1 MN		p-valor	Total de Células Micron.		p-valor	Total MN		p-valor
			N	S		N	S		N	S	
Ex-fumante	Uso de álcool	≤	14	4	> 0,999	14	3	0,638	14	3	0,638
		>	7	2		7	3		7	3	
	> 3 doses semanais	≤	16	2	0,581	16	1	0,128	16	1	0,128
		>	7	2		7	3		7	3	
Controle	Sexo	≤	F 10	M 11	0,439	F 10	M 11	0,439	F 10	M 11	0,439
		>	6	3		6	3		6	3	
	Local	≤	L 9	So 12	0,427	L 9	So 12	0,427	L 9	So 12	0,427
		>	6	3		6	3		6	3	
	Uso de álcool	≤	N 20	S 1	0,517	N 20	S 1	0,517	N 20	S 1	0,517
		>	8	1		8	1		8	1	
	> 3 doses semanais	≤	N 20	S 1	0,517	N 20	S 1	0,517	N 20	S 1	0,517
		>	8	1		8	1		8	1	

Legenda: Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Adotou-se: **Total de Células Micron.** para total de células micronucleadas; ≤ para menor ou igual a média, > para maior ou igual a média; **F** para feminino, **M** para masculino; **L** para língua, **So** para soalho de boca; e **N** para não, **S** para sim.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$), não houve diferença significativa entre as variáveis qualitativas e a frequência de MN avaliadas.

O Teste Exato de Fisher não foi aplicado para a frequência de mais de 1 MN em uma mesma célula, uma vez que dentre os casos considerados nesta análise apenas 1 caso no grupo E-cig, 1 caso no Ex-fumante e nenhum caso no Controle apresentava mais que 1 MN. Portanto, não foi possível realizar análise estatística

para essa frequência.

Para análise das anomalias metanucleares foi utilizado o Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$) para a avaliação da associação das variáveis qualitativas e a frequência de MN. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação da associação das anomalias metanucleares dos grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, e as variáveis sexo, localização e consumo de álcool com a presença de: cariólise, cariorrexe, binucleação, broken egg e *nuclear bud*

(continua)

Grupo	Variável		Cariólise		p-valor	Cariorrexe		p-valor	Binucleação		p-valor	Broken egg		p-valor	Nuclear bud		p-valor
			F	M		F	M		F	M		F	M		F	M	
E-cig	Sexo	≤	3	9	0,344	3	9	0,344	3	8	0,626	3	7	> 0,999	0	7	0,037
		>	3	3		3	3		3	4		3	5		6	5	
	Local	≤	L	So	> 0,999	L	So	0,619	L	So	> 0,999	L	So	0,637	L	So	0,049
		>	6	6		5	7		5	6		4	6		1	6	
	Uso de álcool	≤	3	9	> 0,999	2	10	0,568	4	7	0,119	2	8	> 0,999	0	7	0,119
		>	1	5		2	4		0	7		2	6		4	7	
	> 3 doses semanais	≤	N	S	> 0,999	N	S	0,151	N	S	0,144	N	S	0,664	N	S	0,144
		>	7	5		5	7		8	3		5	5		2	5	
			3	3		5	1		2	5		5	3		8	3	
Ex-fumante	Sexo	≤	F	M	0,692	F	M	0,404	F	M	0,447	F	M	> 0,999	F	M	0,710
		>	8	10		9	10		8	9		7	10		6	10	
	Local	≤	L	So	> 0,999	L	So	0,695	L	So	0,256	L	So	0,706	L	So	0,696
		>	3	6		2	6		3	7		4	6		5	6	
			8	10		9	10		6	11		7	10		8	8	
			4	5		3	5		6	4		5	5		4	7	

Tabela 12 – Avaliação da associação das anomalias metanucleares dos grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, e as variáveis sexo, localização e consumo de álcool com a presença de: cariólise, cariorrexe, binucleação, *broken egg* e *nuclear bud*

(conclusão)

Grupo	Variável		Cariólise		p-valor	Cariorrexe		p-valor	Binucleação		p-valor	<i>Broken egg</i>		p-valor	<i>Nuclear bud</i>		p-valor
			N	S		N	S		N	S		N	S		N	S	
Ex-fumante	Uso de álcool	≤	14	4	> 0,999	15	4	> 0,999	14	3	0,638	13	4	> 0,999	13	3	0,661
		>	7	2		6	2		7	3		8	2		8	3	
	> 3 doses semanais	≤	16	2	0,581	17	2	0,558	15	2	0,612	15	2	0,612	15	1	0,272
		>	7	2		6	2		8	2		8	2		8	3	
Controle	Sexo	≤	15	11	0,315	9	9	0,722	11	8	0,706	10	9	> 0,999	12	7	0,256
		>	1	3		7	5		5	6		6	5		4	7	
	Local	≤	13	13	> 0,999	10	8	0,710	8	11	0,449	9	10	> 0,999	8	11	0,449
		>	2	2		5	7		7	4		6	5		7	4	
	Uso de álcool	≤	25	1	0,252	18	0	0,151	18	1	> 0,999	18	1	> 0,999	18	1	> 0,999
		>	3	1		10	2		10	1		10	1		10	1	
	> 3 doses semanais	≤	25	1	0,252	18	0	0,151	18	1	> 0,999	18	1	> 0,999	18	1	> 0,999
		>	3	1		10	2		10	1		10	1		10	1	

Legenda: Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Adotou-se: ≤ para menor ou igual a média, > para maior ou igual a média de MN; F para feminino, M para masculino; L para língua, So para soalho de boca; N para não, S para sim; e em **negrito** os resultados em que se observa diferença significante ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o Teste Exato de Fisher, houve diferença estatística entre sexo e localização quando correlacionado com *nuclear bud*. O sexo feminino esteve mais associado à presença de *nuclear bud* em comparação com o sexo masculino. E em relação à localização intra-bucal, a língua foi mais afetada por *nuclear bud* do que o soalho bucal. Por outro lado, não foi possível observar diferença entre as demais variáveis qualitativas e as anomalias metanucleares.

4.3 Comparações e Correlações entre os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle

Como já foi explanado nos itens 4.1 e 4.2, de acordo com os critérios de exclusão, os grupos foram organizados, tendo sido necessária a exclusão de participantes que apresentavam consumo de álcool acima de 3 doses semanais.

A organização dos grupos para análise relacionada aos itens 4.3 está demonstrada na Figura 5.

Figura 5 – Divisão dos grupos considerando os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle



Fonte: Elaborada pela autora.

As informações relacionadas ao consumo de tabaco dos grupos Fumante e Ex-fumante (antes da cessação do tabagismo), como número de cigarros consumidos por dia, tempo de tabagismo (anos), concentração de CO (ppm) expirado, e o TFDC, podem ser observadas na Tabela 13. A comparação entre os dados de consumo de tabaco nos grupos Fumante e Ex-fumante foi realizada pelo teste de Mann Whitney ($\alpha=5\%$).

Tabela 13 – Dados da média de consumo de tabaco e nível de dependência nos grupos Fumante e Ex-fumante

	Fumante	Ex-fumante	p-valor
Nº Cigarros/dia	17,05 ± 9,84 [15]	18,09 ± 10,2 [18]	0,7974
Tempo de tabagismo	33,09 ± 11,86 [40]	40,17 ± 12,21 [40]	0,0608
Carga tabágica	29,76 ± 22,09 [23,8]	37,70 ± 27,34 [30]	0,3121
CO (ppm)	10,14 ± 8,72 [8,5]	1,565 ± 0,79 [1]	<0,0001
TFDC	5,5 ± 2,45 [5,5]	6,478 ± 2,23 [7]	0,1292

Legenda: Teste de Mann Whitney ($\alpha=5\%$). Média ± desvio padrão [mediana]. Significância em **negrito** ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desta análise, percebe-se que há diferença estatística entre os grupos Fumante e Ex-fumante em relação ao CO expirado, sendo que o grupo Fumante tem maior concentração expirada do que Ex-fumante.

4.3.1 Avaliação de MN e anomalias metanucleares

Em relação à localização intra-bucal, foram avaliados no grupo Fumante 8 lâminas com amostras provenientes de língua e 14 de soalho bucal, no Ex-fumante 12 de língua e 11 de soalho bucal, e no Controle 13 de língua e 15 de soalho bucal.

Os resultados da comparação da frequência de MN entre os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle, por meio do teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$), podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 – Frequência de MN nos grupos Controle, Fumante e Ex-fumante

	Controle	Fumante	Ex-fumante	p-valor
01 MN	1,32 ± 2,47 [0]	4 ± 3,55 [3]	1,96 ± 2,50 [1]	0,0013
> 01 MN	0 ± 0 [0]	0,137 ± 0,35 [0]	0,04 ± 0,21 [0]	0,1084
Total de células micronucleadas	1,32 ± 2,47 [0]	4,136 ± 3,62 [3]	2 ± 2,61 [1]	0,0009
Total de MN	1,32 ± 2,47 [0]	4,32 ± 3,71 [3,5]	2,04 ± 2,74 [1]	0,0006

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). Média ± desvio padrão [mediana]. Significância em **negrito** ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Houve diferença entre os grupos em todas as variáveis de frequência de MN, exceto em mais de 1 MN em uma mesma célula avaliada.

Ainda para avaliar a diferença entre os grupos, em relação à frequência de MN foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle. A partir deste teste, observou-se diferença estatística nas análises de frequência de MN entre os grupos Fumante e Controle na análise de 1MN ($p = 0,0009$); entre Fumante e Ex-fumante ($p = 0,0489$), Fumante e Controle ($p = 0,0006$) no total de células micronucleadas; e entre Fumante e Ex-

fumante ($p = 0,0370$), também Fumante e Controle ($p = 0,0004$) no total de MN.

Os resultados da comparação das anomalias metanucleares entre os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$), podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 – Dados da análise de anomalias metanucleares entre os grupos Controle, Fumante e Ex-fumante

	Controle	Fumante	Ex-fumante	p-valor
Cariólise	13,39 ± 31,55 [5,5]	36,87 ± 39,05 [22]	21,09 ± 32,92 [7]	0,0035
Cariorrexe	0,79 ± 1,42 [0]	3 ± 3,06 [2]	1,48 ± 2,29 [0]	0,0021
Binucleação	2,14 ± 2,37 [1]	5,32 ± 5,59 [3]	3,78 ± 3,53 [4]	0,0307
Broken egg	0,46 ± 0,74 [0]	1,27 ± 1,39 [1]	0,87 ± 1,60 [0]	0,0521
Nuclear bud	0,68 ± 1,02 [0]	1,96 ± 1,91 [2]	0,65 ± 1,03 [0]	0,0209

Legenda: Teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). Média ± desvio padrão [mediana]. Significância em **negrito** ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se diferença estatística entre os 3 grupos, em todos os tipos de anomalias metanucleares avaliados. Houve maior quantidade no grupo Fumante, seguido pelos grupos Ex-fumante e Controle.

Ainda para avaliar a diferença entre os grupos, em relação à frequência de MN foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, para os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle. De acordo com o teste, observou-se diferença significativa entre as comparações: Fumante e Ex-fumante em cariorrexe ($p = 0,0517$) e *nuclear bud* ($p = 0,0470$); Fumante e Controle em cariólise ($p = 0,0029$), cariorrexe ($p = 0,0016$), binucleação ($p = 0,0291$), *broken egg* ($p = 0,0614$) e *nuclear bud* ($p = 0,0420$); e entre Ex-fumante e Controle não houve diferença significativa em nenhum dos tipos de anomalias metanucleares avaliados.

4.3.2 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis quantitativas

O grau de associação entre duas variáveis foi observado por meio do teste de correlação de Spearman ($\alpha=5\%$).

A frequência de MN nos grupos Fumante e Ex-fumante foi correlacionada com as seguintes variáveis quantitativas: número de cigarros por dia, tempo de uso do cigarro industrializado e carga tabágica, concentração de CO expirado (piCO + Smokerlyzer®) e TFDC. As informações dessas análises são referentes à época em que os indivíduos consumiam cigarro industrializado, exceto a avaliação de concentração de CO expirado, que foi realizada no momento da coleta. Os resultados destas análises configuram as matrizes de correlação, que podem ser observadas nas Tabelas 16 e 17, para os grupos Fumante e Ex-fumante, respectivamente.

Tabela 16 – Matriz de correlação entre a frequência de MN e demais variáveis referentes ao grupo Fumante

		1 MN	> 1 MN	Total de células micronucleadas	Total de MN
Nº cigarros/dia	r	-0,060	-0,181	-0,087	-0,108
	p-valor	0,787	0,418	0,699	0,631
Tempo de Tabagismo (anos)	r	-0,370	-0,083	-0,362	-0,343
	p-valor	0,089	0,710	0,097	0,117
Carga tabágica	r	-0,202	-0,198	-0,223	-0,235
	p-valor	0,365	0,375	0,317	0,291
CO (ppm)	r	0,057	0,010	0,081	0,069
	p-valor	0,800	0,963	0,718	0,758
TFDC	r	-0,116	-0,021	-0,130	-0,148
	p-valor	0,605	0,925	0,562	0,508

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 17 – Matriz de correlação entre a frequência de MN e demais variáveis referentes ao grupo Ex-fumante

		1 MN	> 1 MN	Total de células micronucleadas	Total de MN
Nº cigarros/dia	r	-0,145	0,260	-0,142	-0,142
	p-valor	0,508	0,230	0,515	0,515
Tempo de Tabagismo (anos)	r	-0,243	0,032	-0,244	-0,244
	p-valor	0,262	0,884	0,261	0,261
Carga tabágica anterior	r	-0,195	0,225	-0,194	-0,194
	p-valor	0,371	0,301	0,374	0,374
CO (ppm)	r	-0,148	0,184	-0,142	-0,142
	p-valor	0,499	0,399	0,516	0,516
TFDC	r	-0,311	-0,195	-0,317	-0,317
	p-valor	0,148	0,370	0,139	0,139

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tanto no grupo Fumante, quanto no Ex-fumante, não foi possível observar correlação significativa em nenhuma das variáveis da frequência de MN. Não foi realizada esta correlação para o Controle, uma vez que por ser um grupo controle, estes indivíduos nunca fizeram uso de nenhum tipo de cigarro.

Foi utilizado o teste de Spearman, e para validar a correlação, adotando significância de 5% para p valor, como demonstrado nas Tabelas 18 e 19, para os grupos Fumante e Ex-fumante, respectivamente.

Tabela 18 – Matriz de correlação entre as anomalias metanucleares e demais variáveis de consumo de tabaco ao grupo Fumante

		Cariólíólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
Nº cigarros/dia	r	-0,228	-0,040	-0,399	-0,399	-0,255
	p-valor	0,305	0,856	0,065	0,065	0,251
Tempo de Tabagismo (anos)	r	-0,171	0,257	0,211	-0,022	0,064
	p-valor	0,446	0,247	0,344	0,922	0,776
Carga tabágica	r	-0,179	0,074	-0,232	-0,298	-0,216
	p-valor	0,424	0,743	0,298	0,177	0,333
CO (ppm)	r	0,213	0,068	-0,013	-0,154	0,045
	p-valor	0,339	0,761	0,952	0,493	0,839
TFDC	r	-0,404	0,068	-0,192	-0,276	-0,010
	p-valor	0,062	0,761	0,390	0,212	0,964

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos dados obtidos das correlações para o grupo Fumante, não houve significância entre as variáveis e as anomalias metanucleares avaliadas.

Tabela 19 – Matriz de correlação entre as anomalias metanucleares e demais variáveis referentes ao grupo Ex-fumante

		Cariólíólise	Cariorrexe	Binucleação	<i>Broken egg</i>	<i>Nuclear bud</i>
Nº cigarros/dia	r	0,383	-0,028	0,030	0,294	0,180
	p-valor	0,070	0,898	0,889	0,172	0,410
Carga tabágica anterior	r	0,498	-0,040	0,068	0,207	0,188
	p-valor	* 0,015	0,854	0,756	0,341	0,388
CO (ppm)	r	0,275	-0,261	-0,078	-0,083	-0,172
	p-valor	0,202	0,227	0,722	0,704	0,431
TFDC	r	-0,065	-0,141	-0,027	-0,359	-0,249
	p-valor	0,767	0,520	0,900	0,091	0,250

Legenda: Correlação de Spearman (r). Correlações significantes em **negrito**. *Significância de p valor ($P < 0.05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

No grupo Ex-fumante, notou-se correlação significativa apenas entre carga tabágica anterior e cariólise, tratando-se de uma correlação positiva, ou seja, diretamente proporcional.

4.3.3 Frequência de MN e anomalias metanucleares x variáveis qualitativas

Para esta análise foi realizada associação entre a frequência de MN e as variáveis de sexo e localização intra-bucal das amostras através do Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Os resultados obtidos desta análise, podem ser observados na Tabela 20.

Tabela 20 – Avaliação da associação entre as variáveis de sexo, localização, consumo de álcool e a frequência de 1 MN, total de células micronucleadas e total de MN nos grupos Fumante, Ex-fumante e Controle

Grupo	Variáveis		1 MN		p-valor	Total de Células Micron.		p-valor	Total MN		p-valor
			F	M		F	M		F	M	
Fumante	Sexo	≤	4	7	0,198	8	7	>	6	7	0,414
		>	8	3		4	3		6	3	
	Local		L	So	0,659	L	So	0,193	L	So	0,380
		≤	5	6		7	8		6	7	
		>	3	8		1	6		2	7	
Ex-fumante	Sexo	≤	8	8	>	8	8	>	8	8	>
		>	3	4		3	4		3	4	
	Local		L	So	0,666	L	So	0,666	L	So	0,666
		≤	9	7		9	7		9	7	
		>	3	4		3	4		3	4	
Controle	Sexo	≤	10	10	0,686	10	10	0,686	10	10	0,686
		>	5	3		5	3		5	3	
	Local		L	So	0,409	L	So	0,409	L	So	0,409
		≤	8	12		8	12		8	12	
		>	5	3		5	3		5	3	

Legenda: Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Adotou-se: **Total de Células Micron.** Para total de células micronucleadas. ≤ para menor ou igual a média, > para maior ou igual a média de MN; **F** para feminino, **M** para masculino; **L** para língua, **So** para soalho de boca; e em **negrito** os resultados em que se observa diferença significativa ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o Teste Exato de Fisher, não houve diferença estatística entre as variáveis qualitativas e as frequências de MN.

O Teste Exato de Fisher não foi aplicado para a frequência > 1 MN, uma vez que dentre os casos considerados nesta análise apenas 3 casos no grupo Fumante, 1 caso no Ex-fumante e nenhum caso no Controle apresentava mais que 1MN. Portanto, não foi possível realizar análise estatística para essa frequência, devido à

ausência na maioria dos casos.

Esta análise foi realizada da mesma forma que a associação qualitativa das frequências de MN. Foi utilizado o Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Os resultados obtidos podem ser observados nas Tabelas 21.

De acordo com o Teste Exato de Fisher, houve diferença estatística entre localização quando correlacionado com *nuclear bud*. Em relação à localização intra-bucal, a língua foi mais afetada por *nuclear bud* quando comparado com o soalho bucal. Além disso, não foi possível observar diferença entre as demais variáveis qualitativas e as anomalias metanucleares.

Tabela 21 – Avaliação da associação entre as variáveis sexo, localização, consumo de álcool com a presença de anomalias metanucleares: cariólise, cariorrexe, binucleação, *broken egg* e *nuclear bud* nos grupos Fumante, Ex-fumante e Controle

Grupo	Variável		Cariólise		p-valor	Cariorrexe		p-valor	Binucleação		p-valor	<i>Broken egg</i>		p-valor	<i>Nuclear bud</i>		p-valor
			F	M		F	M		F	M		F	M		F	M	
Fumante	Sexo	≤	7	7	0,674	7	6	> 0,999	5	8	0,099	7	7	0,674	7	6	>
		>	5	3		5	4		7	2		5	3		5	4	
	Local	≤	L	So	> 0,999	L	So	0,187	L	So	0,661	L	So	0,386	L	So	0,026
		>	5	9		3	10		4	9		4	10		2	11	
Ex-fumante	Sexo	≤	8	8	> 0,999	9	10	> 0,999	5	8	0,413	7	8	> 0,999	7	9	0,666
		>	3	4		2	2		6	4		4	4		4	3	
	Local	≤	L	So	> 0,999	L	So	0,316	L	So	0,213	L	So	0,666	L	So	>
		>	8	8		11	8		5	8		7	8		8	8	
Controle	Sexo	≤	14	11	0,583	9	9	0,705	11	7	0,432	9	8	> 0,999	11	7	0,432
		>	1	2		6	4		4	6		6	5		4	6	
	Local	≤	L	So	> 0,999	L	So	0,254	L	So	0,432	L	So	0,700	L	So	0,432
		>	12	13		10	8		7	11		7	10		7	11	
			1	2		3	7		6	4		6	5		6	4	

Legenda: Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Adotou-se: ≤ para menor ou igual a média, > para maior ou igual a média de MN; F para feminino, M para masculino; L para língua, So para soalho de boca; e em **negrito** os resultados em que se observa diferença significante ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

O tabagismo é considerado um problema de saúde pública, que mata mais que a metade de seus usuários (World Health Organization, 2017). Devido às taxas de mortalidade e morbidade ocasionadas pelo uso de tabaco, diversas medidas e alternativas estão sendo criadas para auxiliar o indivíduo no tratamento para cessação tabágica.

Com o intuito de melhorar a qualidade de vida das pessoas, muitas medidas baseadas em evidência são adotadas para promoção da cessação tabágica. Dentre elas existem os suportes comportamentais, suporte telefônico e por mensagens de texto, materiais de auto-ajuda, bem como a utilização de medicamentos que possam auxiliar o processo, reduzindo as sensações de abstinência, como reposição de nicotina. Os medicamentos mais utilizados no mundo são a citisina e a nortriptilina (West et al., 2015).

Os E-cig foram desenvolvidos em 2003, com o intuito de auxiliar a cessação tabágica (Famele et al., 2015), livrando os indivíduos dos malefícios causados pela queima de tabaco e de muitas substâncias presentes no cigarro industrializado. Entretanto, estes dispositivos têm despertado muitas discussões em relação à segurança e efetividade no tratamento do tabagismo. Até o momento não há um consenso consolidado na literatura em relação ao equilíbrio entre riscos e benefícios provenientes destes dispositivos (Rom et al., 2015). Em relação aos benefícios abordados, um fator de peso é a diminuição significativa de substâncias nocivas, em comparação com o cigarro industrializado (Goniewicz et al., 2014; Shahab et al., 2017). Tal fato reduz a exposição desses indivíduos, e dos indivíduos que convivem com eles, a agentes genotóxicos e citotóxicos, com a possibilidade de diminuir a progressão de doenças (Goniewicz et al., 2014; Grana et al., 2014; Famele et al., 2015; Shahab et al., 2017). Além disso, também é abordada a possibilidade de regular a concentração de nicotina, permitindo que o indivíduo que deseja parar com o hábito de fumar, vá reduzindo gradualmente essa substância, o que possibilitaria a eliminação da dependência (Famele et al., 2015; Chun et al., 2017).

Em contrapartida, a possibilidade de regular a nicotina pode ser considerada também um fator de risco, visto que se o intuito do indivíduo não for reduzir a

nicotina, altas concentrações dessa substância podem ser inaladas, não favorecendo a cessação tabágica, e mantendo, ou até mesmo aumentando, a dependência, servindo como porta de entrada para produtos provenientes de tabaco (Rom et al., 2015; Schraufnagel et al., 2014). Acredita-se também, que além da dependência, a nicotina pode ocasionar distúrbios cardiovasculares, prejudicando a saúde dos indivíduos (Carty et al., 1997). Um estudo de Sussan et al. (2015), demonstrou que ratos expostos ao E-cig tiveram resposta imune prejudicada. Outro fator de risco abordado na literatura, é o atrativo que os E-cig têm, como aditivos de sabor (Knorst et al., 2014), favorecendo a introdução de jovens, que nunca fizeram uso do cigarro industrializado, à dependência nicotínica.

Embora não haja comprovação de que o E-cig é um dispositivo que possibilita a cessação de consumo do cigarro industrializado, no presente estudo a maioria dos participantes do grupo E-cig havia abandonado o uso de cigarro industrializado. Embora não signifique, necessariamente, ter sido uma substituição segura. De acordo com Rom et al. (2015), os E-cig bem como tratamentos convencionais para o tabagismo, auxiliam a cessação tabágica. Entretanto, os autores afirmam ser necessário mais estudos que comprovem a eficácia no longo prazo. Truman et al. (2018), também verificaram que a utilização dos E-cig favoreceu a cessação tabágica na maioria dos participantes do estudo que realizaram, e que, dentre os indivíduos avaliados, a maioria iniciou o uso de E-cig para parar ou reduzir o consumo de cigarros industrializados.

Não há na literatura uma escala de dependência nicotínica, validada e rotineiramente utilizada, para quantificar o consumo de cigarro industrializado e o consumo de E-cig ao mesmo tempo. A busca por novas escalas relacionadas ao uso de E-cig é recente (Blank et al., 2016). No presente estudo, o ECSI pôde ser aplicado para os vaporizadores de E-cig e fumantes de cigarro industrializado, por não quantificar o consumo de cigarros, apenas os hábitos relacionados à dependência. A avaliação da dependência nicotínica ainda demonstrou que os indivíduos que fazem uso de E-cig apresentam índice de dependência menor do que os níveis de dependência dos indivíduos ex-fumantes, dados coletados quando iniciaram o tratamento para cessação tabágica.

Foulds et al. (2015) compararam a dependência dos indivíduos antes, quando utilizavam o cigarro industrializado e depois com o uso de E-cig, e

observaram redução dos níveis de dependência. Nesse estudo, foi utilizado um questionário desenvolvido pelos autores a partir de adaptações de outros testes já validados para o cigarro industrializado. Recentemente, Morean et al. (2018) propuseram adaptações no teste psicométrico *Patient-Reported Outcomes Measurement Information System* (PROMIS), para que o teste pudesse ser aplicado em indivíduos que fazem uso de E-cig. Essas modificações parecem ter sido consistentes para utilização.

Uma das maneiras de avaliar e mensurar a nicotina nestes indivíduos é através de um dos seus metabólitos, a cotinina. Em relação à concentração de cotinina no sangue dos indivíduos de E-cig, observou-se na maioria dos participantes, uma concentração compatível com consumidores de grande quantidade de tabaco ado de tabaco, que equivale a mais de 10 cigarros/dia em indivíduos que fazem uso do cigarro industrializado. Essa informação demonstra que os vaporizadores de E-cig fazem uso de altas concentrações de nicotina. O principal problema relacionado à nicotina é a dependência. Entretanto, a nicotina parece desempenhar um menor papel no desenvolvimento de doenças provenientes da fumaça do tabaco, comparado às outras substâncias tóxicas contidas no cigarro industrializado (Benowitz, 2010; Le Houezec et al., 2011; Polosa et al., 2013; Rom et al., 2015). Tal análise é complexa, considerando que muitos indivíduos tiveram dúvidas para quantificar a frequência diária em mL do líquido do E-cig. Outrossim, nos casos dos indivíduos que faziam uso de líquidos com altas concentrações de nicotina, e que o resultado do PTS Detect™ Cotinine System® foi baixo, pode estar relacionado ao fato do participante não ter indicado corretamente a quantidade diária de nicotina utilizada.

O estudo de Shahab et al. (2017) também evidenciou que não houve diferença em relação à ingestão de nicotina entre os indivíduos que faziam uso apenas do E-cig em comparação com o cigarro industrializado. No entanto, observaram níveis reduzidos de substâncias tóxicas e carcinogênicas nos indivíduos que faziam uso de E-cig, comparado aos que faziam uso do cigarro industrializado.

Os níveis de CO expirado avaliados no grupo E-cig estava na maioria abaixo do limite de abstinência (< 6 ppm) (Stelmach et al., 2015). Uma vez que não há queima de tabaco nos E-cig (Famele et al., 2015), tal resultado era esperado. Destarte, foram observados níveis superiores ao limite de abstinência em alguns

casos, bem como diferença significativa nessa variável, em comparação com o grupo Ex-fumante.

O fumo passivo é um fator de suma importância, pois, de acordo com a OMS, a fumaça gerada pelo cigarro industrializado resulta em mais de 4000 substâncias, e destas mais de 50 são consideradas cancerígenas, além de pelo menos 250 serem nocivas (World Health Organization, 2017).

De acordo com o estudo de Kotz (2012), o nível de CO expirado pode ser aumentado por fatores como exposição ao fumo passivo, exposição à poluição do ar (como conviver em áreas de poluição urbana e trabalhos expostos a poluição do ar) e consumo de altas concentrações de álcool, fumo de outras formas de tabaco e cannabis (maconha), entre outros. Alguns destes fatores podem ter influenciado os níveis de CO dos indivíduos do nosso estudo. A maioria das amostras foi coletada de vaporizadores de E-cig, residentes na cidade de São Paulo, que estão expostos à poluição urbana. Entretanto, os indivíduos do grupo Ex-fumante também são residentes do mesmo Município, não podendo então, este ser o fator determinante para o aumento dos níveis de CO expirado. A exposição ao fumo passivo pode ter maior relação, visto que como a comercialização do E-cig não é permitida no Brasil, não existem normas para utilização destes dispositivos em ambientes públicos. Devido a isso, alguns participantes da pesquisa relataram que por vezes, eles utilizam o E-cig na mesma área destinada a fumantes convencionais, o que os torna fumantes passivos em determinadas ocasiões. Outro fator que provavelmente teve influência sobre o CO expirado, é a ingestão de altas concentrações de álcool pelos participantes desse grupo. Outra possibilidade, embora não tenha sido relatada, é o uso esporádico de cigarro industrializado e cannabis.

Já em relação à diferença significativa entre o CO expirado pelos grupos Fumante e Ex-fumante, o resultado obtido foi o esperado, e compatível com o encontrado na literatura. Os indivíduos expostos à fumaça proveniente da queima do tabaco apresentam altos níveis de CO expirado, sendo o tabagismo considerado a causa mais provável de fatores para tal aumento. Os ex-fumantes, por não ter mais exposição à queima de tabaco, apresentam menor concentração de CO expirado, de acordo com o já observado nos estudos de Stelmach et al. (2015) e Goldstein et al. (2017).

A citologia esfoliativa é um método que pode ser utilizado para diagnóstico

precoce de lesões bucais e biomonitoramento, com a vantagem de ser rápida, ter baixo custo, e boa aceitação dos pacientes para realização do exame (Oliveira et al., 2012; Kazanowsk et al., 2014). A análise de MN e anomalias metanucleares, pode ser realizada a partir da citologia esfoliativa, e tem sido utilizada na literatura para verificação de genotoxicidade e citotoxicidade (Rana et al., 2017).

Na comparação dos grupos em relação à frequência de MN, observou-se diferença significativa entre o grupo de E-cig e o grupo Controle. A associação do uso do E-cig e a ingestão de altas concentrações de álcool pode interferir nos danos causados às células. O estudo realizado por Franco et al. (2016), demonstrou que a frequência de MN em indivíduos de E-cig é semelhante à encontrada no grupo controle, e significativamente menor do que a encontrada em indivíduos fumantes de cigarro industrializado. No referido estudo, os indivíduos não faziam uso crônico de álcool.

Outro estudo que reitera essa possibilidade é o de Oliveira et al. (2012), que verificou aumento da frequência de MN nos tabagistas que faziam uso abusivo de álcool em comparação com os tabagistas que não faziam uso, indicando que o álcool pode causar de genotoxicidade celular. Assim, os efeitos genotóxicos promovidos pelo E-cig, podem ser potencializados pelo consumo de álcool. Isto porque o álcool favorece a penetração das substâncias carcinogênicas, atuando como promotor da carcinogênese (Oliveira et al., 2012). Além disso, de acordo com Rana et al. (2017), substâncias provenientes do consumo de álcool, como acetaldeído, induzem o estresse oxidativo que pode promover genotoxicidade.

Estudos que avaliem a frequência de MN em indivíduos ex-fumantes, concomitante ao uso de E-cig não foram encontrados na literatura. A pesquisa realizada evidencia que o grupo Ex-fumante quando comparado com vaporizadores de E-cig e Controle, apresenta frequência intermediária entre os dois grupos.

Na comparação entre os grupos Fumante, Ex-fumante e Controle, os ex-fumantes não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle.

Entretanto, foi constatada diferença entre o grupo Fumante no total de células micronucleadas e no total de MN. Isso significa que uma vez abandonado o hábito de fumar, a tendência é que ocorra redução considerável dos danos citogenéticos nas células da mucosa bucal, diminuindo os riscos da carcinogênese.

O trabalho desenvolvido por Bonassi et al. (2003), avaliou a frequência de

MN em linfócitos de fumantes, ex-fumantes e controle. No geral, não foi possível observar diferenças significativas entre os fumantes e ex-fumantes, o que difere do nosso estudo. Só foi observado diferença nos fumantes pesados que faziam uso de 30 ou mais cigarros por dia. Essa diferença em relação ao presente estudo pode ser justificada pelo fato de ter sido realizada avaliação de linfócitos e não células da mucosa bucal.

O grupo Fumante foi significativamente diferente tanto do grupo Ex-fumante, como já explanado, quanto do grupo Controle na quantidade de 1 MN, total de células micronucleadas e total de MN. Fica evidente então, que o consumo de tabaco promove danos genotóxicos nas células da mucosa bucal. Esses resultados são análogos aos encontrados na literatura (Nersesyan et al., 2011; Nefic, Handzic, 2013; Mr et al., 2014).

Um estudo realizado por Mr et al. (2014), avaliou a frequência de MN em diferentes hábitos relacionados com o tabaco e concluiu que o tabagismo sob qualquer forma promove efeitos genotóxicos nas células. Os indivíduos que faziam uso de tabaco de diferentes formas (como cigarro industrializado, betel e tabaco sem fumaça) e apresentaram maior quantidade de MN quando comparado ao grupo controle.

Em contrapartida, Barale et al. (1998) avaliaram a troca de cromátides irmãs e frequência de MN em indivíduos fumantes, ex-fumantes e controle. Houve aumento na avaliação da troca de cromátides irmãs em fumantes, enquanto os ex-fumantes tiveram redução linear às quantidades semelhantes ao grupo controle em 8 anos. Todavia, em relação à análise de MN, não foi encontrada relação com o hábito de fumar. No presente estudo, a redução de alterações no grupo Ex-fumante foi observada na frequência de MN, o que sugere que em um curto período já ocorre diminuição de danos na mucosa bucal, visto que os indivíduos estavam em abstinência de no máximo de 2 anos.

Quanto às associações, verificou-se no presente estudo que o uso diário do E-cig (mL/dia) foi inversamente proporcional com a frequência de MN, considerando 1 MN, total de células micronucleadas e total de MN. Uma possível justificativa para estes achados pode ser a dificuldade em quantificar a frequência de uso de E-cig em ml/dia pelos vaporizadores. Outrossim, a correlação de TFDC no grupo Ex-Fumante foi inversamente proporcional à frequência de MN, sendo importante considerar que

os dados do TFDC são do início do tratamento para cessação tabágica, ou seja, ao menos 01 ano antes da coleta para avaliação de MN e anomalias metanucleares. Quanto maior era a dependência evidenciada pelo TFDC, menor foi a frequência de MN observado. Destarte, um estudo realizado por Nersesyan et al. (2011), que avaliaram células bucais esfoliadas, sugere que a nicotina pode fornecer proteção às células contra substâncias nocivas ao DNA dos cigarros, haja vista os autores terem encontrado correlação inversa entre a frequência de MN e os níveis de nicotina nos cigarros. Tais resultados corroboram os do presente estudo, pois quanto maior a frequência de utilização dos E-cig com nicotina em ml/dia, maior a ingestão desta substância, bem como quanto maior o TFDC.

Para Chen et al. (2008), a nicotina pode atenuar os efeitos citotóxicos das substâncias presentes no fumo de tabaco, provavelmente, por meio da inibição de vias apoptóticas. Neste estudo, os autores avaliaram a influência dos cigarros industrializados, cigarros com baixa nicotina e cigarros sem nicotina em alguns mecanismos celulares. Verificaram que houve maior inibição no nível de crescimento celular nos cigarros sem nicotina e quando foi adicionado uma concentração de nicotina a esses cigarros, essa inibição de crescimento foi reduzida, tendo sido atribuído à nicotina uma maior sobrevida às células. A inibição da apoptose pelo tabagismo também foi observada por Lima et al. (2015) ao estudar o aumento da expressão da proteína survivina (anti-apoptótica) em tabagistas com consumo superior a 20 cigarros/dia.

Em relação às correlações qualitativas de sexo, localização, e consumo de álcool, não foram identificadas diferenças significantes em nenhum dos grupos, quanto à frequência de MN.

Além da análise de MN, as análises de anomalias metanucleares também foram realizadas neste estudo, pois possibilitam aumentar a especificidade e sensibilidade da detecção de genotoxicidade e citotoxicidade (Cerqueira et al., 2004) que tendem a ser mais prevalentes do que os MN (Tolbert et al., 1992).

O teste de avaliação de MN e anomalias metanucleares tem sido utilizado para averiguar os efeitos que as células podem sofrer do ponto de vista citotóxico e citogenético (Rana et al., 2017).

Torres-Bugarín et al. (2014) em seu estudo explicam que os *broken eggs* e *nuclear buds* são considerados alterações que fazem parte de uma mesma

categoria, cujo núcleo principal sofre uma forte constrição que forma um lóbulo de material nuclear. Tolbert et al. (1992) propuseram que estas estruturas deveriam ter cerca de 1/3 do tamanho do núcleo principal, que posteriormente foi descrito por Bhattathiri et al. (1998) com a denominação de *nuclear bud*. No entanto, outros autores sugerem que esses lóbulos podem apresentar tamanhos maiores, chegando a tamanhos similares ao do núcleo principal, que denominam *broken eggs* (Bolognesi et al., 2013; Torres-Bugarín et al., 2014). Há quem considere os *broken eggs* e *nuclear buds* anomalias distintas (Cerqueira et al., 2004). Contudo, no presente estudo quantificamos separadamente, mas por vezes serão discutidos concomitantemente, devido à essa associação utilizada em muitos estudos na literatura.

Em relação à comparação das anomalias metanucleares entre os grupos E-cig, Ex-fumante e Controle, os indivíduos que faziam uso de E-cig apresentaram genotoxicidade e citotoxicidade significativamente maior do que os grupos Ex-fumante e o Controle, exceto em cariorrexe que não houve diferença entre os grupos. Essa citotoxicidade apresentada no grupo E-cig, pode estar relacionada com as substâncias nocivas, como formaldeído, acetaldeído e acroleína, que podem ser produtos secundários as reações químicas que ocorrem com o aumento das temperaturas nos líquidos do dispositivo (Goniewicz et al., 2014; Famele et al., 2015; Javed et al., 2017; Chun et al., 2017).

Estudos que avaliem as anomalias metanucleares em indivíduos que utilizam E-cig e ex-fumantes não foram encontrados na literatura até o momento.

O fato de não ter sido observada diferença significativa entre o grupo Ex-fumante e o grupo Controle, reforça a ideia de que os efeitos nocivos provenientes do tabaco podem diminuir com a cessação tabágica.

É fato que o tabagismo promove também o aumento de anomalias metanucleares, como constatado no presente estudo, pois houve maior quantidade de todas as anomalias metanucleares nos indivíduos do grupo Fumante, sendo as comparações sempre significantes em relação ao Controle, e significativa em cariorrexe e *nuclear bud* quando comparado ao grupo Ex-fumante.

No estudo realizado por Oliveira et al. (2012) não foi feita distinção entre *broken eggs* e *nuclear bud*. Os autores encontraram diferença significativa entre o grupo fumante sem associação de álcool e o controle para *broken egg* e

binucleação, porém, não houve diferença significativa para cariólise e cariorrexe como no presente estudo.

Outro estudo que também demonstrou alterações em fumantes foi o realizado por Nersesyan et al. (2011), em que avaliaram a frequência de MN e de anomalias metanucleares, que fizeram uso de cigarros com diferentes tipos de filtro e sem filtro, bem como um grupo controle. Foi observado que houve aumento significativo das anomalias cariólise, cariorrexe, binucleação e *broken egg* nos indivíduos que faziam uso de cigarros com filtro médio e sem filtro. Observaram ainda, que a binucleação e *broken egg* representaram maior sensibilidade do que os MN, pois apresentaram diferenças mais significantes entre os grupos avaliados. Na análise de MN, um dos grupos de fumantes apresentou um número 3 vezes maior que o controle, enquanto que nas análises de binucleação e *broken eggs* foi 7 e 17 vezes maior, respectivamente.

Quanto às associações quantitativas realizadas no grupo de E-cig e anomalias metanucleares foi encontrada diferença significativa entre o tempo de tabagismo anterior e a presença de *nuclear bud*. Esse achado é de extrema importância, uma vez que indica que a exposição aos cigarros industrializados anteriormente, ainda exerce influência nas células da mucosa bucal desses indivíduos. O que difere dos achados de Nersesyan et al. (2011) que não encontraram correlação entre os indicadores de toxicidade e exposição cumulativa.

O CO expirado no grupo E-cig associado à cariorrexe e binucleação, também foram diretamente proporcionais. À partir desses achados, podemos presumir que o aumento de CO teve efeito genotóxico nas células da mucosa bucal dos indivíduos de E-cig. Isto porque cariorrexe induzida por apoptose e binucleação estão relacionados com a iniciação da carcinogênese por meio de agentes genotóxicos (Tolbert et al., 1992). Além disso, pode haver relação com o fato de que o CO expirado promove redução do transporte de oxigênio no sangue (Goldstein et al., 2017), e a diminuição do suprimento de oxigênio nos tecidos pode favorecer a instabilidade das células levando à morte celular.

A presença de cariólise foi diretamente relacionada a concentração de cotinina no sangue dos indivíduos de E-cig. Assim, pode ser indicativo de que a nicotina estimula a morte celular por necrose, caracterizando citotoxicidade (Tolbert et al., 1992) e conferindo à nicotina uma ação promotora.

Na correlação entre o TFDC e *broken egg* e *nuclear bud* do grupo Ex-fumante, e entre ECSI e cariólise a correlação foi inversamente proporcional, bem como na análise de MN. Como já discutido anteriormente, apesar da cessação, os indivíduos foram expostos a maior concentração de nicotina, que pode ter atenuado a exacerbação desse tipo de anomalia, assim como na avaliação de MN. Nersesyan et al. (2011) observaram correlação inversa entre alguns tipos de anomalias metanucleares (cariólise, cariorrexe e binucleação) e os níveis de nicotina nos cigarros, porém, não em *broken eggs*.

A correlação da cariólise com número de cigarros consumidos por dia e carga tabágica foi significativa e diretamente proporcional em Ex-fumante. A carga tabágica e o número de cigarros fumados por dia são variáveis intimamente ligadas, uma vez que a carga tabágica depende da quantidade de cigarros fumados por dia. Sendo assim, quanto mais cigarros o indivíduo fuma, maior é a carga tabágica. O aumento proporcional de cariólise, pode ser atribuído à liberação de diversas substâncias cancerígenas pelo cigarro a que esses indivíduos estavam expostos anteriormente. Nersesyan et al. (2011), também verificaram que a cariólise, cariorrexe e binucleação aumentaram de acordo com a maior exposição ao alcatrão presente no cigarro. Oliveira et al. (2012), encontraram correlação entre o número de cigarros fumados por dia e a frequência de MN, em indivíduos fumantes.

A correlação diretamente proporcional entre a carga tabágica dos indivíduos e cariólise foi significativa no grupo Ex-fumante e pode estar relacionada à maior exposição a substâncias nocivas que esses indivíduos foram submetidos. Tal correlação sugere que de fato a quantidade de cigarros fumados pelos indivíduos anteriormente, ainda gera influência sobre o DNA das células da mucosa bucal.

As variáveis de sexo, localização das amostras e consumo de álcool, não foram significativas nos grupos, exceto na associação entre *nuclear bud* de E-cig. Constatou-se maior presença de *nuclear bud* no sexo feminino e em língua. Aslantürk e Aşkin Çelik (2017) avaliaram a presença de MN e anomalias metanucleares em células da mucosa bucal de cabelereiros expostos a substâncias que possam causar riscos, e também encontraram uma maior frequência de *nuclear bud* em mulheres do que em homens, sendo que no grupo controle não foram encontrados *nuclear buds* nos homens.

Alguns estudos demonstraram essa relação maior em mulheres também para a frequência de MN, principalmente com o aumento da idade (Barale et al., 1998; Fenech, 1998; Nefic, Handzic, 2013), e essa diferença foi atribuída à perda do cromossomo X (Hando et al., 1994).

Já a localização pode ser justificada pelo fato de que a língua no momento da vaporização estabelece maior contato com o vapor e calor do que o soalho bucal. Além disso, a língua é o local em boca com piores prognósticos acometido pelos carcinomas de células escamosas (Brandizzi et al., 2008). E uma vez que os *nuclear bud* indicam alterações genotóxicas que podem ser indicativos da carcinogênese (Tolbert et al., 1992), é justificável que a língua tenha sido mais acometida.

A mesma associação entre a língua e os *nuclear buds* evidenciada no grupo E-cig foi encontrado no grupo Fumante.

Existem limitações no presente trabalho em relação ao grupo E-cig, como a dificuldade de encontrar participantes que não façam uso de álcool concomitante, além da dificuldade em padronizar as concentrações de líquidos utilizados pelos vaporizadores de E-cig e uma escala de dependência nicotínica. Entretanto, o trabalho contribui para a discussão de novos aspectos escassos na literatura relacionados ao tema. A saber, a dependência nicotínica, a comparação dos danos citogenéticos e citotóxicos em vaporizadores de E-cig e ex-fumantes; a influência do álcool associado ao uso de E-cig; e a expressiva redução de danos à mucosa bucal provenientes da cessação tabágica em um curto período de tempo (2 anos).

6 CONCLUSÃO

Vaporizadores de E-cig apresentaram danos citotóxicos e citogenéticos significativos para as anomalias metanucleares quando comparados aos indivíduos ex-fumantes, embora sem significância para MN. Contudo, os danos observados não podem ser atribuídos exclusivamente ao uso do E-cig, uma vez que a maioria dos vaporizadores também consomem álcool e histórico de consumo de cigarros industrializados. Concluimos também, que o cigarro industrializado causa efeitos citotóxicos e genotóxicos, que apresentam redução expressiva nos primeiros 2 anos após a cessação tabágica.

REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A Anvisa e o controle dos produtos derivados do tabaco. Brasília: ANVISA [acesso em 2016 Dez 20]; 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106510/106594/A+Anvisa+e+o+Controle+dos+Produtos+Derivados+do+Tabaco/4af73983-9d76-4af4-93c0-e35f153a18a7>.

Aslantürk ÖS, Aşkin Çelik T. Genotoxic risk assessment in professionals working hairdressers area using buccal micronucleus assay, in Aydın City, Turkey. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017 Jun;24(17):14700-5. doi: 10.1007/s11356-017-9075-5. PubMed PMID: 28456919.

Barale R, Chelotti G, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardin H, et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*. 1998;31(3): 228-42. PubMed PMID: 9585261.

Benowitz N. Nicotine addiction. *Prim Care*. 1999;26(3):611–31. PubMed PMID: 10436290.

Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(192):29-60. doi: 10.1007/978-3-540-69248-5_2. PubMed PMID: 19184645.

Bhattathiri NV, Bharathykkutty C, Prathapan R, Chirayathmanjiyil DA, Nair KM. Prediction of radiosensitivity of oral cancers by serial cytological assay of nuclear changes. *Radiother Oncol*. 1998 Oct;49(1):61-5. PubMed PMID: 9886699.

Blank MD, Breland AB, Cobb CO, Spindle T, Ramôa C, Eissenberg T. Clinical laboratory evaluation of electronic cigarettes/electronic nicotine delivery systems: methodological challenges. *Tob Regul Sci*. 2016 Oct;2(4):426-439. doi: 10.18001/TRS.2.4.12. PubMed PMID: 28819633.

Bloching M, Hofman A, Lautenschlager CH, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol*. 2000;36:550–5. PubMed PMID: 11036250.

Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay: an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013 Oct-Dec;753(2):100-13. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.07.002. PubMed PMID: 23942275.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 2003 Mar;543(2):155-66. PubMed PMID: 12644185.

Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Sep 1;13(9):E544-8. PubMed PMID: 18758396.

Cahn Z, Siegel M. Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes? *J Public Health Policy.* 2011 Feb;32(1):16-31. doi: 10.1057/jphp.2010.41. PubMed PMID: 21150942.

Carty CS, Huribal M, Marsan BU, Ricotta JJ, Dryjski M. Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 1997 Apr;25(4):682-8. PubMed PMID: 9129624.

Carvalho MB, Ramirez A, Gattás GJF, Guedes AL, Amar A, Rapoport A, et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Rev Assoc Med Bras.* 2002;48(4):317–22. PubMed PMID: 12563459.

Çelik A, Çavas T, Ergene-Gozukara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis.* 2003;18:417–21. PubMed PMID: 12960409.

Cerqueira EM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res.* 2004 Aug 8;562(1-2):111-7. PubMed PMID: 15279834.

Chen J, Higby R, Tian D, Tan D, Johnson MD, Xiao Y, et al. Toxicological analysis of low-nicotine and nicotine-free cigarettes. *Toxicology.* 2008 Jul 30;249(2-3):194-203. doi: 10.1016/j.tox.2008.05.009. PubMed PMID: 18599178.

Chun LF, Moazed F, Calfee CS, Matthay MA, Gotts JE. Pulmonary toxicity of e-cigarettes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017 Aug 1;313(2):L193-L206. doi: 10.1152/ajplung.00071.2017. PubMed PMID: 28522559.

Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, et al. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. *Sci Rep.* 2016 Sep 29;6:34424. doi: 10.1038/srep34424. PubMed PMID: 27680676.

Dietz J, Diehl AS, Prolla JC, Furtado CD, Furtado AD. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):207–11. PubMed PMID: 11070510.

Dosi T, Gupta D, Hazari A, Rajput R, Chauhan P, Rajapuri AS. Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016 Aug;6(Suppl 2):S143-7. doi: 10.4103/2231-0762.189745. PubMed PMID: 27652247.

Dutra A, Pak E, Wincovitch S, John K, Poirier MC, Oliverob OA. Nuclear bud formation: a novel manifestation of zidovudine genotoxicity. *Cytogenet Genome Res*. 2010 May; 128(1-3):105–110. doi: 10.1159/000298794. PubMed PMID: 20407220.

Fagerström K. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerstrom Test for Cigarette Dependence. *Nicotine Tob Res*. 2012 Jan;14(1):75-8. doi: 10.1093/ntr/ntr137. PubMed PMID: 22025545.

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. PubMed PMID: 25257980.

Fenech M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res*. 1998 Aug 3;404(1-2):155-65. PubMed PMID: 9729354.

Fontes PC, Correa GHM, Issa JS, Almeida JD. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers. *Anal Quant Cytol Histol*. 2008 Feb;30(1):16-24. PubMed PMID: 18459583.

Foulds J, Veldheer S, Yingst J, Hrabovsky S, Wilson SJ, Nichols TT, et al. Development of a questionnaire for assessing dependence on electronic cigarettes among a large sample of ex-smoking E-cigarette users. *Nicotine Tob Res*. 2015 Feb;17(2):186-92. doi: 10.1093/ntr/ntu204. PubMed PMID: 25332459.

Franco T, Trapasso S, Puzzo L, Allegra E. Electronic Cigarette: Role in the primary prevention of oral cavity cancer. *Clin Med Insights Ear Nose Throat*. 2016 Oct 17;9:7-12. doi: 10.4137/CMENT.S40364. PubMed PMID: 27773997.

Freitas MD, Garcia-Garcia A, Carneiro JLM, Crespo-Abeleira A, Gándara-Rey JM. Citologia esfoliativa da mucosa oral: comparação citomorfométrica da mucosa oral normal em pacientes com câncer oral e indivíduos saudáveis. *RBPO*. 2003;2: 2–6 8.

Gerloff J, Sundar IK, Freter R, Sekera ER, Friedman AE, Robinson R, et al. Inflammatory response and barrier dysfunction by different e-cigarette flavoring chemicals identified by gas chromatography-mass spectrometry in e-liquids and e-vapors on human lung epithelial cells and fibroblasts. *Appl In Vitro Toxicol*. 2017 Mar 1;3(1):28-40. doi: 10.1089/aivt.2016.0030. PubMed PMID: 28337465.

Goldstein AO, Gans SP, Ripley-Moffitt C, Kotsen C, Bars M. Use of expired air carbon monoxide testing in clinical tobacco treatment settings. *Chest*. 2018 Feb;153(2):554-62. doi: 10.1016/j.chest.2017.11.002. PubMed PMID: 29137909.

Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, et al. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014 Mar;23(2):133-9. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2012-050859. PubMed PMID: 23467656.

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. PubMed PMID: 24821826.

Hando JC, Nath J, Tucker JD. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma*. 1994 Jun;103(3):186-92. PubMed PMID: 7924621.

Hatsukami DK, Stead LF, Gupta PC. Tobacco addiction: diagnosis and treatment. *lancet*. 2008 June 14; 371(9629):2027–38. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60871-5. PubMed PMID: 18555914.

Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerström KO. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br J Addict*. 1991 Sep;86(9):1119-27. PubMed PMID: 1932883.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659:93–108. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007. PubMed PMID: 18514568.

Instituto Nacional de Câncer. Ações de prevenção primária e secundária no controle do câncer. In: Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. rev. atual. e ampl. Rio de Janeiro: INCA [acesso em: 2016 Dez 20]; 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/>.

Instituto Nacional de Câncer. 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. Rio de Janeiro: INCA [acesso: 2016 Dez 20]; 2016. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/cigarros_eletronicos.pdf.

Issa JS. A new nicotine dependence score and a new scale assessing patient comfort during smoking cessation treatment. *J Bras Pneumol*. 2012 Nov-Dec;38(6):761-5. PubMed PMID: 23288122.

Javed F, Kellesarian SV, Sundar IK, Romanos GE, Rahman I. Recent updates on electronic cigarette aerosol and inhaled nicotine effects on periodontal and pulmonary tissues. *Oral Dis*. 2017 Feb 6. doi: 10.1111/odi.12652. PubMed PMID: 28168771.

Kaisar MA, Kallem RR, Sajja RK, Sifat AE, Cucullo L. A convenient UHPLC-MS/MS method for routine monitoring of plasma and brain levels of nicotine and cotinine as a tool to validate newly developed preclinical smoking model in mouse. *BMC Neurosci*. 2017 Oct 11;18(1):71. doi: 10.1186/s12868-017-0389-5. PubMed PMID: 29020944.

Kazanowska K, Hałoń A, Radwan-Oczko M. The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology - contemporary knowledge with review of the literature. *Adv Clin Exp Med*. 2014 Mar-Apr;23(2):299-305. PubMed PMID: 24913123.

Knorst MM, Benedetto IG, Hoffmeister MC, Gazzana MB. The electronic cigarette: the new cigarette of the 21st century? *J Bras Pneumol*. 2014 Oct;40(5):564-72. PubMed PMID: 25410845.

Kotz D. Possible reasons for elevated carbon monoxide levels in self-reported ex-smokers. *Nicotine Tob Res*. 2012 Aug;14(8):900-1. doi: 10.1093/ntr/ntr305. PubMed PMID: 22259146.

Kreiss K, Gomaa A, Kullman G, Fedan K, Simoes EJ, Enright PL. Clinical bronchiolitis obliterans in workers at a microwave-popcorn plant. *N Engl J Med*. 2002 Aug 1;347(5):330-8. PubMed PMID: 12151470.

Kumar M, Prasad UC, Chandolia B, Manjunath SM, Basu S, Verma S. Can Feulgen Stain be a Reliable Biomarker over PAP Stain for Estimation of Micronuclei Score? *J Clin Res Diagn*. 2016 Oct;10(10):ZC07-ZC11. doi: 10.7860/JCDR/2016/18859.8630. PubMed PMID: 27891448.

Le Houezec J, McNeill A, Britton J. Tobacco, nicotine and harm reduction. *Drug Alcohol Rev*. 2011 Mar;30(2):119-23. doi: 10.1111/j.1465-3362.2010.00264.x. PubMed PMID: 21375611.

Lima CF, Crastechini E, Issa JS, Balducci I, Cabral LA, Almeida JD. Evaluation of apoptotic pathway in oral mucosa by smoking in a Brazilian Outpatient Smoking Cessation Program. *Int J Cardiol*. 2015 Apr 1;184:514-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.02.103. PubMed PMID: 25756583.

Lima CF, Oliveira LU, Cabral LA, Brandao AA, Salgado MA, Almeida JD. Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(6):441-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00887.x. PubMed PMID: 20412399.

Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):311-6. PubMed PMID: 15093538.

Morean M, Krishnan-Sarin S, Sussman S, Foulds J, Fishbein H, Grana R, et al. Psychometric evaluation of the Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS) nicotine dependence item bank for use with electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res*. 2018 Jan 2. doi: 10.1093/ntr/ntx271. PubMed PMID: 29301008.

Mr P, Guruprasad Y, Jose M, Saxena K, K D, Prabhu V. Comparative study of genotoxicity in different tobacco related habits using micronucleus assay in exfoliated buccal epithelial cells. *J Clin Diagn Res*. 2014 May;8(5):ZC21-4. doi: 10.7860/JCDR/2014/8733.4357. PubMed PMID: 24995238.

Narayan TV, Shilpashree S. Meta-analysis on clinicopathologic risk factors of leukoplakias undergoing malignant transformation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016 Sep-Dec;20(3):354-61. doi: 10.4103/0973-029X.190900. PubMed PMID: 27721597.

Nefic H, Handzic I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res*. 2013 Apr 30;753(1):1-11. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.03.001. PubMed PMID: 23499242.

Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis*. 2011 Mar;26(2):295-301. doi: 10.1093/mutage/geq092. PubMed PMID: 21044989.

Oliveira LU, Lima CF, Salgado MA, Balducci I, Almeida JD. Comparative study of oral mucosa micronuclei in smokers and alcoholic smokers. *Anal Quant Cytol Histol*. 2012;34(1):9-14. PubMed PMID: 22590814.

Polosa R, Rodu B, Caponnetto P, Maglia M, Raciti C. A fresh look at tobacco harm reduction: the case for the electronic cigarette. *Harm Reduct J*. 2013 Oct 4;10:19. doi: 10.1186/1477-7517-10-19. PubMed PMID: 24090432.

Queiroz JB, Lima CF, Burim RA, Brandao AA, Cabral LA, Almeida JD. Exfoliative cytology of the oral mucosa: comparison of two collection methods. *Gen Dent*. 2010 Sep-Oct;58(5):e196-9. PubMed PMID: 20829152.

Rana SVS, Verma Y, Singh GD. Assessment of genotoxicity amongst smokers, alcoholics, and tobacco chewers of North India using micronucleus assay and urinary 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine, as biomarkers. *Environ Monit Assess*. 2017 Aug;189(8):391. doi: 10.1007/s10661-017-6103-3. PubMed PMID: 28702879.

Reichert J, Araujo AJ, Goncalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MP, et al. Diretrizes para cessação do Tabagismo - 2008. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845-80. PubMed PMID: 19009219.

Roberts DM. Comparative cytology of the oral cavity of snuff users. *Acta Cytol*. 1997;41:1008-14. PubMed PMID: 9250292.

Rom O, Pecorelli A, Valacchi G, Reznick AZ. Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Mar;1340:65-74. doi: 10.1111/nyas.12609. PubMed PMID: 25557889.

Santos-Silva AR, Carvalho Andrade MA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, et al. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014 Jan;145(1):103-7. doi: 10.1016/j.ajodo.2012.09.026. PubMed PMID: 24373660.

Schraufnagel DE, Blasi F, Drummond MB, Lam DC, Latif E, Rosen MJ, et al. Electronic cigarettes. A position statement of the forum of international respiratory societies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Sep 15;190(6):611-8. doi: 10.1164/rccm.201407-1198PP. PubMed PMID: 25006874.

Scully C, Felix DH. Oral Medicine: update for the dental practitioner. Oral cancer. *Br Dent J*. 2006;200:13-7. PubMed PMID: 16415822.

Shahab L, Goniewicz ML, Blount BC, Brown J, McNeill A, Alwis KU, et al. Nicotine, carcinogen, and toxin exposure in long-term e-cigarette and nicotine replacement therapy users: a cross-sectional study. *Ann Intern Med*. 2017 Mar 21;166(6):390-400. doi: 10.7326/M16-1107. PubMed PMID: 28166548.

Siebers TJ, Bergshoeff VE, Otte-Höller I, Kremer B, Speel EJ, van der Laak JA, et al. Chromosome instability predicts the progression of premalignant oral lesions. *Oral Oncol*. 2013 Dec;49(12):1121-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.006. PubMed PMID: 24075955.

Smokerlyzer: piCO™ [ficha técnica]. Maidstone: Bedfont® Scientific Ltd [acesso 2017 Mar 01]; 2017. Disponível em: <https://www.bedfont.com/file/2488-LAB679%20Smokerlyzer%20Manual%20Issue%203.pdf>

Stelmach R, Fernandes FL, Carvalho-Pinto RM, Athanazio RA, Rached SZ, Prado GF, et al. Comparison between objective measures of smoking and self-reported smoking status in patients with asthma or COPD: are our patients telling us the truth? *J Bras Pneumol*. 2015;41(2):124-32. doi: 10.1590/S1806-37132015000004526. PubMed PMID: 25972966.

Stich HF, Curtis JR, Bibhuti BP. Application of the MN test to exfoliated cells of high cancer risk groups: Tobacco chewers. *Int J Cancer*. 1982;30:553–559 12. PubMed PMID: 6759419.

Stratton K, Shetty P, Wallace R, Bondurant S. Clearing the Smoke: the Science Base for Tobacco Harm Reduction. *Tobacco Control*. 2001;10:189–95. PubMed PMID: 11387543.

Sussan TE, Gajghate S, Thimmulappa RK, Ma J, Kim JH, Sudini K, et al. Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS One*. 2015 Feb 4;10(2):e0116861. doi: 10.1371/journal.pone.0116861. eCollection 2015. PubMed PMID: 25651083.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77. PubMed PMID: 1371831.

Torres-Bugarín O, Zavala-Cerna MG, Nava A, Flores-García A, Ramos-Ibarra ML. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis Markers*. 2014;2014:956835. doi: 10.1155/2014/956835. PubMed PMID: 24778463.

Truman P, Glover M, Fraser T. An online survey of New Zealand vapers. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Jan 29;15(2). pii: E222. doi: 10.3390/ijerph15020222. PubMed PMID: 29382129.

U.S. Department of Health & Human Services. The health consequences of smoking: nicotine and addiction. A report of the surgeon general, 1988. Atlanta, Ga.: Centers for Disease Control and Prevention (US); DHHS Publication No. (CDC) 88-8406; 1998.

Warnakulasuriya S, Dios PD, Lanfranchi H, Jacobson JJ, Honghua, Rapidis A. Global cancer forum: understanding gaps in the oral cancer continuum and developing strategies to improve outcomes [Internet] [acesso em: 2016 Jun 28]; 2016. Disponível em: <http://www.globaloralcancerforum.org/img/White-Paper-Group-2.pdf>

West R, Raw M, McNeill A, Stead L, Aveyard P, Bitton J, et al. Health-care interventions to promote and assist tobacco cessation: a review of efficacy, effectiveness and affordability for use in national guideline development. *Addiction*. 2015 Sep;110(9):1388-403. doi: 10.1111/add.12998. PubMed PMID: 26031929.

World Health Organization. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva: WHO, 2001.

World Health Organization. Tobacco. [Internet]; 2017 [acesso em: 2018 Fev 02]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>

Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol*. 1998 SepOct;16(5):557–64. PubMed PMID: 9787965.

Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, Cummins SE, Gamst A, Yin L, Lee M. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*. 2014 Jul;23 Suppl 3:iii3-9. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2014-051670. PubMed PMID: 24935895.

APÊNDICE A - Ficha de coleta sobre o estudo citológico

“INVESTIGAÇÃO DOS DANOS CITOTÓXICOS E CITOGENÉTICOS NA MUCOSA BUCAL DE CONSUMIDORES DE DIFERENTES FORMAS DE TABACO”.

Nome:.....
 Sexo:.....Cor:.....Idade:.....Data nasc...../...../.....
 Residência:.....
 Profissão:.....
 Bairro.....Cidade.....Estado.....Fone.....

1. Você fuma? () sim () não

2. Se fuma, qual o tipo?

() cigarro de papel com filtro

() cigarro eletrônico

3. Há quanto tempo?

.....

4. Qual a frequência do seu consumo de cigarros?.....

CO:Nicotina capilar:.....

5. Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?

() sim () não

6. Que tipo de bebida você consome quando bebe?

() cerveja () batida () caipirinha () uísque () vinho

() outras.....

7. Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?

() 1 a 2; () 3 a 4; () 5 a 6; () 7 a 9; () 10 ou mais;

* destilado (whisky, vodka, pinga): 36ml;

* cerveja: 350 ml.

* vinho: 120ml

8. Qual a frequência que você consome 6 ou mais doses de bebidas alcoólicas em uma só ocasião?

() nunca menos que mensalmente

() mensalmente diariamente

9. Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?

() sim () não

10. Quando você bebe, consome mais cigarro?

() sim () não

Quanto a mais você

consome?.....

11. Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas? Quais?

() sim () não

.....

12. Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?

() 1 ou menos de uma vez por mês uma vez ao dia

() 1 a 3 vezes por semana mais de uma vez ao dia

13. Faz uso de algum medicamento? sim não

Qual(is)?.....

.....

..

14.Exame clínico:

Extra- bucal

.....

.....

Intra- bucal

.....

.....

15. Monóxido de carbono:

.....

* OMS: AUDIT. Projeto viver bem 2000. Folheto UNESP.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42387315.0.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.033.312

Data da Relatoria: 17/04/2015

Apresentação do Projeto:

O trabalho ora apresentado pretende realizar estudos direcionados ao conhecimento genético individual na tentativa de novas classificações das diversas apresentações das neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Estudos de genotipagem, metilação e expressão gênica tem sido o direcionamento dos atuais estudos, em conjunto com o conhecimento dos efeitos do tabaco e do perfil tabágico, juntamente com outros fatores como uso abusivo de álcool dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, podem direcionar a uma melhor compreensão do problema resultando a promoção de tratamentos mais eficazes, menos invasivos e principalmente mais eficientes.

Cumpriu todas as etapas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar a metilação dos genes supressores de tumor, expressão gênica relacionados ao metabolismo do tabaco, análise da ploidia do DNA, análise da saliva e de células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) intra-bucal em busca de correlação clinicopatológica entre tabagismo e o prognóstico da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O benefício para o participante do estudo é indireto, existindo o benefício relevante de participar

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@fosjc.unesp.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:	ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL
----------------------	--

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF: 09218849824	Nome: JANETE DIAS ALMEIDA
Telefone: (12) 3947-9078	E-mail: janete@fosjc.unesp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 48.031.918/0014-49	Nome da Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF	Nome
291.777.128-38	Celina Faig Lima Carta

Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
75335247649	ADRIANA ÁVILA DE ALMEIDA
29177712838	Celina Faig Lima Carta
62817795687	CELSON MULLER BANDEIRA
00442145373	Monica Ghislaine Oliveira Alves

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Outros

Título Público da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL

Contato Público

CPF	Nome	Telefone	E-mail
09218849824	JANETE DIAS ALMEIDA	(12) 3947-9078	janete@fosjc.unesp.br

Contato Celina Faig Lima Carta

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42387315.0.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: tcle e justificativa

Justificativa: Inclusão do aparelho PTS Detect₂ Cotinine System® (PTS Diagnostics, Indianapolis,

Data do Envio: 15/02/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.963.403

Apresentação da Notificação:

O objetivo desta notificação é comunicar ao Comitê de Ética em Pesquisa que o aparelho PTS Detect™ Cotinine System® (PTS Diagnostics, Indianapolis, USA) será utilizado para avaliação da concentração de nicotina no sangue capilar dos pacientes, para teste objetivo do consumo. Isto porque a comercialização do cigarro eletrônico não é legalizada, então a real concentração nicotínica indicada pelo fabricante do produto, pode não ser fidedigna por não haver a fiscalização devida. A avaliação é feita por meio de uma gota de sangue obtida por punção capilar (ponta de dedo), semelhante ao que é feito em avaliação de glicemia capilar (Dextro). Esta gota é coletada e inserida no aparelho que mensura a concentração de nicotina, a qual é classificada pelo fabricante da seguinte forma: não tabagistas (<25 ng/mL), possível

exposição passiva (25-40 ng/mL), consumo leve de tabaco d (41-199 ng/mL, de 1 a 9

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@fosjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 1.963.403

cigarros/dia), consumo pesado de tabaco (>200 ng/mL, mais de 10 cigarros/dia).

Objetivo da Notificação:

Inclusão do aparelho PTS Detect Cotinine System® (PTS Diagnostics, Indianapolis, USA) será utilizado para avaliação da concentração de nicotina no sangue capilar dos pacientes, para teste objetivo do consumo. Além disso, enviamos Termo de consentimento livre esclarecido a ser utilizado para os pacientes que participarão apenas das coletas de material por meio de citologia esfoliativa da mucosa bucal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

nd

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

nd

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

nd

Recomendações:

nd

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência foi resolvida.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acta o parecer da relatora.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	tcle.pdf	15/02/2017 11:02:28	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	justificativa.pdf	15/02/2017 11:03:45	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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@fosjc.unesp.br

ANEXO B – Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros

Teste de Fagerström para Dependência a Cigarros			
1) Quanto tempo, logo após acordar, você fuma o 1º cigarro			
Dentro de 5 minutos (3)	Entre 6-20 min (2)	Entre 31-60 min (1)	Após 60 min (0)
2) Para você é difícil não fumar em lugares proibidos?			
Sim (1)		Não (0)	
3) Qual dos cigarros que fuma durante o dia lhe dá mais satisfação?			
O primeiro da manhã (1)		Os outros (0)	
4) Quantos cigarros você fuma por dia?			
Menos de 10 (0)	Entre 10-20 (1)	Entre 21-30 (2)	Entre 31 (3)
5) Você fuma frequentemente pela manhã?			
Sim (1)		Não (0)	
6) Você fuma mesmo doente, quando precisa ficar acamado a maior parte do tempo?			
Sim (1)		Não (0)	
Total:			

ANEXO C – Escore de Consumo Situacional Issa

Apresentação do Escore de Consumo Situacional Issa, utilizado para a avaliação de fumantes que consomem até 10 cigarros/dia. 1. Necessita fumar para melhorar atenção, concentração e produção?	
Sim (1)	Não (0)
2. Necessita fumar quando está ansioso(a), tenso(a) ou preocupado(a)?	
Sim (1)	Não (0)
3. Necessita fumar quando está triste ou aborrecido(a)?	
Sim (1)	Não (0)
4. Necessita fumar quando está tomando bebida alcoólica, após refeição ou quando está em ambientes festivos?	
Sim (1)	Não (0)
Resultados: cada resposta “sim” equivale a 1 ponto. Até 1 ponto: baixa dependência; 2-3 pontos: moderada dependência; e 4 pontos: alta dependência.	