UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
FERNANDA RODRIGUES DOS SANTOS

RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM SALIVA DE PACIENTES FUMANTES

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

FERNANDA RODRIGUES DOS SANTOS

RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM SALIVA DE PACIENTES FUMANTES

Tese apresentada ao Programa de Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica, na área de concentração bioengenharia, biotecnologia e biomateriais.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Monica Ghislaine Oliveira Alves

MOGI DAS CRUZES, SP

202

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

R696r

Rodrigues, Fernanda dos Santos
Resposta inflamatória em saliva de pacientes fumantes / Fernanda Rodrigues dos Santos. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
205 f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Monica Ghislaine Oliveira Alves.

1. Cachimbo de água 2. Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina 3. Saliva 4. Citocinas I. Alves, Monica Ghislaine Oliveira II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 610.28

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

UMC
UNIVERSIDADE

Tel.: (11) 4798-7000
0800 19 2001
www.umc.br

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às treze horas do dia dois de julho de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada "RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM SALIVA DE PACIENTES FUMANTES". para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Fernanda Rodrigues dos Santos.** Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 74 (setenta e quatro), a saber: 38 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores: Monica Ghislaine Oliveira Alves, Elis Andrade de Lima Zutin e Caio Junji Tanaka, da Universidade de Mogi das Cruzes, Vanessa Marques Meccatti Domiciano e Luciane Dias de Oliveira do ICT UNESP – Campus São José dos Campos, sob a presidência da primeira como orientadora do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pela senhora presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovada (aprovado(a) / reprovado(a)) por unanimidade (unanimidade/maioria).

Mogi das Cruzes, 02 de julho de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Caio Junji Tanaka Prof. Dr. Caio Junji Tanaka	Aprovada
Luciane Dias de Oliveira Profª Drª Luciane Dias de Oliveira	aprovada
Elis Andrade de Lima Zutin Profª Drª Elis Andrade de Lima Zutin	aprovada
Vanessa M. Meccatti Profª Drª Vanessa Marques Meccatti Domiciano	Aprovada
Mônica Ghislaine Oliveira Alves Profª Drª Mônica Ghislaine Oliveira Alves	aprovada

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Monica Ghislaine Oliveira Alves, por toda dedicação e paciência, por ser uma grande inspiração, compreensiva e sobretudo humana, sou grata pelos ensinamentos científicos e pelos valores de vida, ensinados por ela.

Aos meus professores do curso de odontologia da Universidade de Mogi das Cruzes, Sérgio Oliveira, Fábio Dupart, Neivaldo José e Desiree Cavalcanti e ao meu professor de pósgraduação da Faculdade São Leopoldo Mandic, Lívio di Pillo (in memorian), que sempre me incentivaram a seguir a carreira acadêmica.

À professora Maysa e ao professor Rodolfo, que se empenharam e contribuíram grandemente com seus conhecimentos, aprimorando este trabalho.

Aos meus colegas de turma, em especial Ellen Greenfield, minha grande amiga do mestrado, sempre disposta a ajudar e ser um ombro amigo.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Vocês foram essenciais, muito obrigada!

DEDICATÓRIA

À Deus, minha fonte de vida. Aos meus pais, José e Roseli, que sempre me proporcionaram o melhor que a vida pode oferecer, de maneira honesta e idônea, com apoio além do material, com muito amor,
zelo e respeito, vibrando com as minhas conquistas.
Ao meu irmão, Felipe (in memorian), o qual sinto falta todos os dias, mas com a certeza de que em breve iremos nos reencontrar.

Aos meus amigos, que compreenderam meus momentos de ausência e me apoiaram durante esta jornada, em especial, minha amiga Bruna (in memorian), que partiu durante a construção deste trabalho, em decorrência do uso de narguilé, que este trabalho colabore da melhor maneira, para que outras pessoas não passem por isso.

EPÍGRAFE

"E sabemos que todas as coisas contribuem
juntamente para o bem daqueles que amam a Deus,
daqueles que são chamados segundo o seu propósito."
(Romanos 8:28)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de mediadores inflamatórios e proteína Klotho em saliva de pacientes com o hábito de fumar narguilé, cigarros convencionais e cigarros eletrônicos (ecig), bem como correlacionar os níveis com dados clínicos, salivares e de consumo de tabaco. As amostras foram obtidas através de saliva total, constituindo-se quatro grupos. O grupo cigarro foi composto por indivíduos fumantes de cigarros industrializados, exclusivamente. O grupo narguilé foi composto por indivíduos fumantes de narguilé, exclusivamente. O grupo cigarros eletrônicos, por indivíduos vaporizadores de cigarros eletrônicos, exclusivamente. E o grupo não-fumante: foi composto por indivíduos não-fumantes. Foram coletados dados clínicos e informações sobre o perfil de consumo de álcool e tabaco. Os testes imunoenzimáticos foram realizados para análise dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, bem como dos fatores de crescimento e da proteína Klotho. Foram utilizados teste de Kruskal-Wallis, teste de comparações múltiplas de Dunn, Mann e correlação de Spearman, sendo valor de $p < 0,05$ considerado significativo. Observou-se níveis salivares mais elevados em citocinas inflamatórias de IL-2 ($p< 0,0001$), IL-6 ($p< 0,0001$), IL1β ($p< 0,0001$), e TNFα ($p< 0,0001$) entre os fumantes de narguilé e cigarro industrializados, em comparação com o controle. Em relação aos níveis salivares de VEGF ($p< 0,0001$) e Klotho ($p< 0,0001$), observou-se reduzidos na saliva dos fumantes de narguilé e cigarro convencionais. Observou-se diferença estatisticamente significativa em todos os mediadores estudados, com aumento da expressão em usuários de e-cig em IL2 (p-valor < 0,0001), IL6 (p-valor < 0,0001), TNF (p-valor = 0,02) e VEGF (p-valor < 0,0001), e redução da expressão em KLOTHO (p-valor = 0,01) e IL10 (p-valor < 0,0001). Em relação às correlações dos níveis salivares e dados clínicos, observou-se apenas correlação negativa estatisticamente significante entre idade e expressão de IL1-beta no grupo narguilé (coeficiente de correlação de Spearman= -0,465183, p -valor=0,0012) e idade e a proteína Klotho no grupo cigarro (coeficiente de correlação de Spearman= -0,4552852, p -valor=0,038). Em relação aos consumidores de cigarros eletrônicos comparados com o grupo controle, observou-se diferença estatísticamente significativa em todos os mediadores estudados, com aumento da expressão em usuários de e-cig em IL2 (p-valor < 0,0001), IL6 (p-valor < 0,0001), TNF (p-valor = 0,02) e VEGF (p-valor < 0,0001), e redução da expressão em KLOTHO (p-valor = 0,01) e IL10 (p-valor < 0,0001). Além de correlação negativa estatisticamente significante entre idade e expressão de IL10 (coeficiente de correlação de Spearman= 0,43; p -valor=0,02) nos pacientes fumantes de cigarro eletrônico. Diante dos resultados, concluímos que pacientes fumantes de narguilé, cigarro convencional e cigarro eletrônico apresentam ambiente salivar pró-inflamatório. Além disso, a menor expressão de Klotho na saliva dos fumantes sugere potencial envelhecimento prematuro das células.

Palavras-chave: saliva; citocinas; cigarros eletrônicos; narguilé; tabagismo; ELISA.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the expression of inflammatory mediators and Klotho protein in the saliva of individuals who smoke hookah, conventional cigarettes, and electronic cigarettes,

as well as to correlate these levels with clinical, salivary, and tobacco consumption data. Samples were obtained from whole saliva, comprising four groups. The cigarette group included 26 individuals who exclusively smoked manufactured cigarettes. The hookah group consisted of 33 individuals who exclusively smoked hookah. The electronic cigarette group included 25 individuals who exclusively used electronic cigarettes. The non-smoker group was composed of individuals who did not smoke. Clinical data and information regarding alcohol and tobacco consumption profiles were collected. Immunoenzymatic assays (ELISA) were performed using the Human ELISA MAX™ Deluxe BioLegend kit to analyze the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, as well as growth factors and the Klotho protein. The Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons test, and the Mann-Whitney test were used to assess statistical significance between groups, while Spearman's correlation analysis was used to examine associations between cytokines and clinical data. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Higher salivary levels of inflammatory cytokines IL-2 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), IL-1β ($p < 0.0001$), and TNF-α ($p < 0.0001$) were observed among hookah and conventional cigarette smokers compared to the control group. Regarding salivary levels of VEGF ($p < 0.0001$) and Klotho ($p < 0.0001$), reduced concentrations were observed in smokers' saliva. A statistically significant difference was found in all mediators analyzed, with increased expression among electronic cigarette users for IL-2 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), TNF ($p = 0.02$), and VEGF ($p < 0.0001$), and decreased expression for Klotho ($p = 0.01$) and IL-10 ($p < 0.0001$). Regarding correlations between salivary levels and clinical data, a statistically significant negative correlation was found between age and IL-1β expression in the hookah group (Spearman's correlation coefficient = 0.465183, $p = 0.0012$), and between age and Klotho protein expression in the cigarette group (Spearman's correlation coefficient = -0.4552852, $p = 0.038$). In comparison to the control group, users of electronic cigarettes showed statistically significant differences in all analyzed mediators, with increased expression of IL-2 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), TNF ($p = 0.02$), and VEGF ($p < 0.0001$), and decreased expression of KLOTHO ($p = 0.01$) and IL-10 ($p < 0.0001$). Additionally, a statistically significant negative correlation was observed between age and IL-10 expression (Spearman's correlation coefficient = -0.43; $p = 0.02$) among electronic cigarette users. Based on these findings, we conclude that users of hookah, conventional cigarettes, and electronic cigarettes present a proinflammatory salivary environment. Furthermore, the reduced salivary expression of Klotho in smokers suggests a potential for premature cellular aging.

***Keywords**: saliva; cytokines; electronic cigarettes; hookah. Smoking; ELISA.*

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1. Distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e significância estatísticas das comparações.....37

Figura 2. Análise da curva ROC para distinguir o grupo Narguilé do grupo Controle usando mediadores inflamatórios salivares e dados de expressão da proteína Klotho. Para IL-2: Sensibilidade de 87,5%, especificidade de 83,27% (AUC=0,975 (IC95% 0,946-1); p<0,001). Para IL-6: Sensibilidade de 78,1%, especificidade de 75% (AUC=0,792 (IC95% 0,674-0,910); P<0,001). Para IL1-β: Sensibilidade de 74,2%, especificidade de 96,3% (AUC=:0,898 (IC95% 0,817-0,980); P<0,001). Para TNF-α: Sensibilidade de 100%, especificidade de 100% (AUC=1 (IC95% 1-1); P<0,001). Para VEGF: Sensibilidade de 100%, especificidade de 96,9% (AUC=0,998 (IC95% 0,992-1); P<0,001). Para Klotho: Sensibilidade de 89,7%, especificidade de 77,4% (AUC=0,886 (IC95% 0,802-0,970); P<0,001).....40

Artigo 2

Figura 1. Distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e significância estatísticas das comparaçõe.……..…85

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Distribuição da amostra em relação a idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo e escore de risco relacionado ao álcool.....38
Tabela 2. Correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos por meio e de expressão da cotinina. do teste de correlação de Spearman no grupo narguilé.....38
Tabela 3. Correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos e expressão da cotinina por meio do teste de correlação de Spearman no grupo cigarro.....39

Artigo 2

Tabela 1. Distribuição da amostra em relação a idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo e escore de risco relacionado ao álcool…..……...……..83
Tabela 2. Dados relacionados ao consumo de cigarros eletrônicos: período, frequência de uso seminal, número de sessões por dia, tempo de consume em cada sessão, quantidade de e-líquido por dia, quantidade de nicotina consumida por dia, uso simultâneo e aumento do consumo com álcool…….84
Tabela 3. Correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos por meio e de expressão da cotinina. do teste de correlação de Spearman no grupo e-cig.....86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCE: Carcinoma de Células Escamosas
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
E-cig: Cigarros Eletrônicos
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EVALI: lesão pulmonar associada ao cigarro eletrônico e vaping

Mg: Miligrama

Ml:Mililitro

Ng: Nanograma

PNCT: Programa Nacional de Controle ao Tabagismo

RNA: Ácido Ribonucleico

SUS: Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO DE LITERATURA 15

2.1 Tabagismo 15

2.2 Narguilé 17

2.3 Cigarros Eletrônicos 19

2.4 Saliva 21

2.5 Mediadores Inflamatórios 22

3. OBJETIVOS 25

4. ESCLARECIMENTOS 26

5. ARTIGO 1 26

6. ARTIGO 2 74

REFERÊNCIAS 124

APÊNDICES 187

Apêndice 1 – Versão em Inglês do Artigo 1, nas Normas do Periódico "JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY AND MEDICINE (ISSN: 0904-2512) 188

APÊNDICE 2 – Versão em inglês do artigo 3 nas normas do periódico "ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY AND ORAL RADIOLOGY" (ISSN: 2212-4403) 236

Apêndice 3 – Ficha de Coleta de Dados Sobre o Estudo 237

ANEXOS.....244

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – Artigo 1.....245
Anexo 2 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – Artigo 2.....250 Anexo 3 – AUDIT.....253

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Instituto Nacional do Câncer, o tabagismo é considerado o maior fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias e agravamento de doenças crônicas, inclusive em jovens, sendo classificado como doença crônica causada pela dependência à nicotina, e incluído no grupo de transtornos mentais e comportamentais gerados pelo uso de substâncias psicoativas, além de uma questão de saúde pública (INCA, 2014, 2016, 2018; WHO, 2021).

Atualmente, existem diversas formas de tabagismo, sendo todas consideradas nocivas à saúde geral e bucal (Urrutia-Pereira *et al*., 2019) e amplamente relacionadas com o desenvolvimento de câncer de boca, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) o mais comum. O risco associado ao tabagismo ao desenvolvimento dessa neoplasia maligna é elevado, de 04 a 15 vezes maior do que em indivíduos que não consomem tabaco (Brentani; Anelli, 2003; Duarte, 2016; INCA, 2017; Le Campion et al., 2016), fato que está ligado à presença de agentes carcinogênicos, como nitrosamininas e hidrocarboneto policíclico, que juntamente aos impactos térmicos geram alterações na mucosa oral, favorecendo a transformação maligna (Vieira; Aguiar; Souza, 2015; Barbosa Filho; Campos; Lopes, 2012; Semlali *et al*., 2011).

O público jovem vem sendo bastante atraído pelas novas formas de fumar, como o narguilé e os cigarros eletrônicos (e-cig), este fato se dá ao uso de aromatizantes e flavorizantes na composição, aumentando a aceitação do produto, além disso, são vistos como menos prejudicial à saúde (Boykan; Goniewicz; Messina, 2019; Araujo, 2016; Maziak *et al*., 2015).

O narguilé possui filtro de água e durante seu uso, acontece combustão incompleta do tabaco, devido a temperatura inferior ao cigarro convencional, essa diferença faz com que haja concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas que são inaladas pelo usuário. Já são identificados além da nicotina, cerca de 300 produtos químicos na fumaça do narguilé, sendo 82 tóxicos e cerca de 23 cancerígenos, responsáveis por doenças cardiorrespiratórias e câncer (Hammal *et al.*, 2015; Shihadeh *et al*., 2015; Torrey *et al*., 2015).

Os e-cig foram introduzidos no mercado a fim de atuar como método auxiliar na cessação do tabaco, todavia, a sua popularização aconteceu também entre os não fumantes, devido a maior aceitação social, que ocorre por sua aparência moderna, seus aromas e sabores agradáveis (Filippidis et al., 2017; Gustafsson, 2013; Mirbolouk et al., 2018; Rubinstein et al., 2018; Shiplo; Czoli; Hammond, 2015; Siegel; Tanwar; Wood, 2011; State Fact Sheets, 2022). Apesar da proibição da comercialização, importação e propaganda dos e-cig no Brasil pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária desde 2009, o produto é facilmente encontrado para compra no comércio informal (Bertoni et al., 2019; Cavalcante et al., 2017).

Os e-cig já são vistos como um problema de saúde pública, seus aditivos e solventes são capazes de gerar compostos tóxicos e cancerígenos, além de liberar nanopartículas de metais tóxicos do dispositivo e do líquido, por conta do aquecimento (Kosmider et al., 2014; O'Connell; Graff; D'Ruiz, 2016). Esses dispositivos contam com um líquido saborizado a base de nicotina. Apesar de no Brasil existir limite de nicotina de 1mg por unidade, os cigarros eletrônicos apresentam alta concentração de cerca de 57mg por ml do líquido. Além disso, quando o dispositivo é acionado, sua temperatura chega a cerca de 350ºC, transformando o líquido em vapor, esse vapor quente inalado, pode levar a alterações químicas e físicas na composição dos líquidos, aumentando o nível de toxicidade das substâncias (Boykan; Goniewicz; Messina, 2019; INCA, 2019; Kosmider et al., 2014; Ministério da Saúde do Brasil, 2023).

A saliva é um fluído composto em cerca de 99% de água e o restante de alguns compostos inorgânicos e orgânicos, como enzimas e proteínas. É proveniente de glândulas salivares maiores e menores e sua composição é variável, de acordo com alterações fisiológicas e advindas de medicamentos ou hábitos, inclusive o tabagismo. Em seu uso como alternativa diagnóstica e método de estudo, exibe diversas vantagens, como coleta não invasiva, havendo uma boa aceitação por parte do paciente. Além disso, trata-se de um método financeiramente acessível e rápido (Jia et al., 2017; Kaluarachchi et al., 2016a; Navale et al., 2023a; RapadoGonzález et al., 2016; Siravegna et al., 2017).

A resposta inflamatória tem um papel de extrema importância na defesa conta infecções, sendo os mediadores inflamatórios importantes nos processos inflamatórios agudos e crônicos, gerando respostas locais e sistêmicas, além de desempenharem funções primordiais no sistema imunológico e nas respostas imunes. As citocinas podem ser pró-inflamatórias ou antiinflamatórias (Graves; Li; Cochran, 2011; Kim; Jenrow; Brown, 2014; Palata et al., 2019; Yoon et al., 2012), podendo ter diferentes funções, interferindo na síntese do RNA e de proteínas celulares, na indução das células T helper. Adicionamente, esses mediadores inflamatórios podem ser mensurados por meio da saliva (Liskmann et al., 2006; Okada; Murakami, 1998; Sheeran; Hall, 1997).

A proteína multifuncional α-Klotho atua como protetora do envelhecimento e em patologias associadas. Sua propriedade antienvelhecimento foi analisada primeiramente há cerca de 27 anos, em um estudo realizado em camundongos homozigotos para um gene αKlotho hipomórfico, os camundongos em estudo apresentaram diversas reações como atrofia dos

órgãos, crescimento atrofiado, calcificação acentudada das artérias, osteopenia, déficit cognitivo, doença pulmonar similar a enfisema e outras doenças, além de uma vida curta, por outro lado, os camundongos transgênicos que apresentaram uma expressão aumentada da proteína Klotho, eram saudáveis e com a expectativa de vida maior (Buchanan et al., 2020b; Kuro-o, 2019a; Kuro-O* et al., 1997a; Kurosu et al., 2005; Prud'homme; Wang, 2024b; Tang et al., 2023). O primeiro estudo em humanos ocorreu em 2010, com a finalidade de mensurar o nível sérico circulante, e descobriu-se que crianças saudáveis apresentavam níveis com significância estatística maiores cm comparação à adultos, ou seja, o nível sérico era inversamente associado a idade, estando sua deficiência associado envelhecimento (Kuro, 2021; Yamazaki et al., 2010).

Além disso, Klotho é potencialmente influente no gerenciamento de diversas doenças, podendo ser um biomarcador para algumas, como o adenocarcinoma pancreático e o câncer de mama, que apresentam uma expressão reduzida de Klotho. Neste sentido, a medição e quantificação do Klotho em fases iniciais de algumas patologias podem ser determinantes para diagnóstico, tratamento e prognóstico, principalmente em condições que podem apresentar um longo período de latência (Abraham; Li, 2022; Abramovitz et al., 2011; Wolf et al., 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TABAGISMO

O tabagismo é classificado pelo Instituto Nacional do Câncer como uma doença crônica causada pela dependência em nicotina. No final do século XIX e início do século XX, foi descrita uma epidemia do consumo do tabaco, devido ao avanço industrial na produção de cigarros e o investimento em publicidade e propaganda, apresentando o hábito tabágico como algo moderno e sociável, principalmente por meio do cinema, popularizando o produto e aumentando seu consumo.(Bernardes-Souza et al., 2018; Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2022)

De acordo com a Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10), o tabagismo é parte do grupo de transtornos mentais e comportamentais, gerados pelo uso de substâncias psicoativas (Bernardes-Souza et al., 2018; Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2022; Nacional De Câncer; Gomes Da Silva, *[S.d.]*).

A nicotina, presente nas diversas formas de tabaco, é extremamente prejudicial em acometimentos pulmonares, como por exemplo na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema pulmonar e broncoconstrição, também pode alterar a expressão de proteínas em células de músculos lisos e endoteliais, além disso, estimula a via dopaminérgica e dessensibiliza o GABA, via regulatória da dopamina, podendo levar o usuário a dependência (Chalon et al., 2000; Mishra et al., 2015; Vezina; McGehee; Green, 2007). Na cavidade oral, a nicotina gera um processo chamado nitrosação, que gera nitrosaminas específicas do tabaco, com altas propriedades carcinogênicas (Kassem et al., 2017; Mishra et al., 2015; Scherr et al., 2018; St. Helen et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), por meio do relatório de tendências de tabaco, destaca que o número de tabagistas no mundo, em 2024, ultrapassou 1.25 bilhões de pessoas, por meio de uma forte política de controle, o tabagismo no Brasil, entre adultos, está em declínio, porém, o consumo de tabaco entre adolescentes e jovens adultos vêm aumentando, principalmente com a popularização dos cigarros eletrônicos e outras formas de consumo, como o narguilé (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2019; OPAS/OMS, 2019; Soares, 2018; Urrutia-Pereira et al., 2019).

A forma mais comum de tabagismo, é o cigarro industrializado, que consiste em tabaco posicionado e enrolado em um papel, porém, hoje em dia existem outras formas de consumo

bastante populares, como charuto, cachimbo, cigarros de palha, narguilé e cigarros eletrônicos (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2019; Soares, 2018; Urrutia-Pereira et al., 2019).

A Convenção-Quadro sobre Controle do Uso do Tabaco (CQCT/OMS) foi o primeiro tratado internacional de saúde pública da história da Organização Mundial da Saúde. O artigo 14 diz respeito as medidas de redução de demanda relativa da dependência e à cessação do consumo do tabaco (INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2024; Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2022, 2025).

Segundo o Ministério da Saúde, estima-se que em 2025, cerca de 10 milhões de óbitos ocorram no Brasil, em decorrência de doenças relacionadas ao hábito tabágico. Neste contexto, o PNCT é articulado pelo Ministério da Saúde por meio do acional do Câncer (INCA) e tem como objetivo reduzir a prevalência de fumantes e a consequente mortalidade relacionada aos produtos derivados do tabaco no Brasil, adotando um modelo de prevenção por meio de ações educativas, atenção à saúde e buscando o cumprimento de medidas legislativas e econômicas, visando evitar a iniciação do tabagismo, principalmente entre crianças, e adolescente e jovens. Este programa articula redes de tratamento do tabagismo no Sistema Único de Saúde (SUS), por meio de diversos programas e campanhas. A portaria GM/MS nº502, de 1º de junho de 2023, instituiu o PNCT no SUS, trazendo responsabilidades e obrigações à entes federativos, para desenvolvimento, implementação e coordenação do PNCT em sua área de abrangência (INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2024; Santos, 2018; WHO – World Health Organization, 2021).

O consumo regular de tabaco e a dependência à nicotina podem ser associados a diversos fatores, como características sociodemográficas, idade, sexo e religião, o ambiente de convívio como influência de amigos, ambiente escolar e até um mau desempenho nos estudos, problemas psicológicos, uso associado a drogas ilícitas, além de relações familiares conflituosas (Da Silva Lopes III; Cordeiro Barbosa Filho, 2012; Menezes et al., 2011; Panatto et al., 2013; Schlauch et al., 2013).

O fator importante a ser discutido, é o preço dos produtos relacionados ao tabaco, já que o Brasil tem o quinto menor preço na região das Américas para o maço de 20 cigarros, sendo o tabaco a segunda droga mais consumida pelos jovens brasileiros, ficando apenas atrás do álcool (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009; Bertoni; Szklo, 2021).

A prevalência do tabagismo vem apresentando uma redução significativa com o passar dos anos, segundo dados do Vigitel, que apontam que houve queda no hábito entre adultos de 2006 a 2019. Outra pesquisa, a PeNSE (Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) junto ao Ministério da Saúde e ao Ministério da Educação, com o propósito de obter dados referentes à vigilância dos fatores de

risco e doenças crônicas não transmissíveis do Brasil, que aborda os hábitos, cuidados e fatores de risco para a saúde dos adolescentes, em última edição em 2019, observou resultados semelhantes (Nacional De Câncer; Gomes Da Silva, *[S.d.]*; Oliveira et al., 2017).

O número de usuários de produtos derivados de tabaco, fumado ou não fumado, em uso diário ou ocasional, foi de 20,4 milhões de pessoas, sendo 12,8% da população, 14,3% em área rural e 14,7% na região sul do país (Figura 1) (Pesquisa Nacional de Saúde, *[S.d.]*).

O relatório elaborado pela Divisão de Controle do Tabagismo apontou que, em 2018, o número de pacientes que procuraram o SUS para programas de cessação do hábito tabágico foi de 163.995 mil, aumentando para 210.941 em 2019, e em 2021 atingiu 100.891 mil pacientes, em 2022 com 142.041 mil e em 2023 com 226.269 mil pacientes (Figura 2) (Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2022).

Em análise por sexo, os homens apresentam maior prevalência do que mulheres, 16,2% e 9,8%, respectivamente. Quanto ao nível de instrução, predominam pessoas sem instrução alguma ou com o ensino fundamental incompleto (17,6%) e quanto à faixa etária, o maior percentual é de 40 a 59 anos de idade (14,9%) (Figura 3) (Pesquisa Nacional de Saúde, *[S.d.]*).

Entre os adolescentes, a prevalência do uso de cigarros foi de 6,80%, enquanto que o uso de qualquer outro produto de tabaco foi de 14,83. Os usuários tinham, predominantemente, a pele preta, com idade entre 16 e 17 anos, relatam não ter supervisão familiar e fazer uso associado a outros produtos de tabaco, outras drogas e álcool (Malta et al., 2024; Pesquisa Nacional de Saúde, *[S.d.]*). Adicionalmente, quando comparados os índices da PeNSE de 2015 e 2019, o consumo de narguilé teve aumento na prevalência, assim com o uso de cigarros eletrônicos e cigarros de palha em 2019 (Malta et al., 2024; Pesquisa Nacional de Saúde, *[S.d.]*).

Ainda é importante destacar que, atualmente, as redes sociais e influenciadores, também apresentam um grande papel na popularização dos produtos à base de tabaco. Diversas estratégias de marketing e venda de produtos, especialmente os cigarros eletrônicos ocorrem pelas redes sociais, mesmo diante da proibição realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 46/2009 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009; Bertoni; Szklo, 2021).

2.2. NARGUILÉ

O narguilé, também conhecido como shisha, hookah ou water pipe, é um dispositivo capaz de aquecer substâncias a base de tabaco, através de um carvão. Sua fumaça passa por um filtro de água antes de ser aspirada e chega a uma mangueira conectada a um bocal, por onde é

aspirada. Esse dispositivo de fumar surgiu na Índia, no século XVII, e popularizou-se no Oriente Médio. Após a década de 1990, com a introdução de aromatizantes e flavorizantes, o produto tornou-se mais palatável e jovens de todo mundo sentiram-se atraídos ao seu consumo (Da Silva; Moreira, 2019; Malta et al., 2018; Maziak et al., *[S.d.]*; Ward, 2015).

A presença do filtro de água no narguilé é a principal justificativa para vê-lo como menos prejudicial à saúde, todavia a função da água é resfriar a fumaça, facilitando a inalação mais profunda e, consequentemente aumentando o contato da fumaça com os pulmões. Entretanto, o consumo do narguilé é mais prejudicial quando comparado com cigarros industrializados convencionais (Maziak et al., *[S.d.]*; Souza; Szklo; De Almeida, 2018; WHO – World Health Organization, 2021).

O uso do narguilé é visto como sociável, por ser um dispositivo único que pode ser compartilhado, este fato associado ao sabor agradável faz com que as sessões durem horas, todavia após 45 minutos de uso, os batimentos cardíacos, as concentrações plasmáticas de nicotina e de monóxido de carbono expirado aumentam, assemelhando-se ao consumo de 100 cigarros (Maziak et al., *[S.d.]*; Menezes et al., 2015).

Além disso, é comum o uso de outros produtos à base de tabaco e ilícitos junto as essências de narguilé, aumentando os danos à saúde. As essências associadas ao carvão utilizado no aquecimento geram metais pesados, tóxicos e de difícil eliminação que são aspirados pelo consumidor (Malta et al., 2018; Souza; Szklo; De Almeida, 2018).

O consumo de narguilé está ligado ao aumento de 2,5 vezes no risco de acidente vascular cerebral (AVC) quando comparado a não fumantes, este fato pode estar ligado ao aumento da atividade plaquetária, dos tromboxanos e fibrinogênio, alterando a função endotelial (AlMomany et al., 2019; Blachman-Braun et al., 2014; Bou Fakhreddine; Kanj; Kanj, 2014; ElHajj et al., 2019; Qasim et al., 2019; Tabrizi et al., 2020).

O lúmen da mangueira do narguilé pode acumular partículas de tabaco e quando entram em contato com a laringe podem gerar uma inflamação, que pode levar a alterações na frequência da voz.

Além disso, o hábito de fumar narguilé também é associado a questões odontológicas, como perda óssea alveolar e problemas periodontais (Helen et al., 2014; Kassem et al., 2017; Mishra et al., 2015; Scherr et al., 2018). Assim como em fumantes de cigarros industrializados, saúde oral é diretamente prejudicada pelo uso de narguilé, observa-se maior índice de placa é maior, perda de inserção e perda óssea marginal e profundidade de sondagem, além de maior número de dentes ausentes (Natto; Baljoon; Bergström, 2005; Sundar et al., 2016).

O tabaco utilizado nesses dispositivos contém diversas substâncias classificadas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer) como carcinógenos humanos (IARC – International Agency for Research on Cancer, *[S.d.]*), tais como nitrosaminas, hidrocarbonetos poliaromáticos, aldeídos e metais pesados (St. Helen et al., 2014). Assim, proteínas relacionadas a proliferação celular, invasão, migração e metástase em vários tipos de câncer, como esofágico, pulmonar e de cabeça e pescoço, são estimuladas pelo uso do narguilé, assim como há o aumento do estresse oxidativo (Naik; Cucullo, 2015).

Adicionalmente, é possível observar superexpressão da proteína p53, alterações proteômicas e genômicas relacionados ao consumo de narguilé (Dittrich Santos et al., 2011; Klumb; Cavalcanti Júnior, 2002; Patil et al., 2019a, 2019b, 2019c).

2.3. CIGARROS ELETRÔNICOS

Os e-cig, também chamados de dispositivos eletrônicos para fumar (DEFs), possuem formato semelhantes a canetas ou pen-drives e são compostos por uma bateria e um cartucho com um líquido, conhecido como e-liquído, composto por nicotina, aromatizantes, aditivos de sabor e outras substâncias químicas. Esses componentes são aquecidos, transformando-se em vapor que é inalado, sendo substâncias citotóxicas e carcinogênicas, associadas a doenças pulmonares e cardiovasculares (Barufaldi et al., 2021a; Hess et al., 2017; NIDA - National Institute on Drug Abuse, 2020).

Os e-cig surgiram com o intuito de auxiliar na cessação do tabagismo, todavia, atua como um produto de iniciação, visto que vários jovens que não consomem cigarros convencionais são atraídos pelo aroma, sabor e formatos modernos (Almeida et al., *[S.d.]*; Bertoni; Szklo, 2021; Cavalcante et al., 2017; Chatham-Stephens et al., 2019; Da Silva Machado Barradas et al., 2021; Glasser et al., 2018; Soneji et al., 2017).

Desde 2009, a ANVISA proibiu a comercialização, importação e propaganda de cigarros eletrônicos no Brasil, visto que o consumo desses dispositivos está associado a alterações respiratórias, aumento da pressão arterial e taquicardia, além de uma quantidade de nicotina equivalente a 20 cigarros convencionais (Barrington-Trimis; Leventhal, 2018; Barufaldi et al., 2021b; Amorim Filho *et al*., 2020; Hammond et al., 2018).

A nicotina presente na maioria dos cigarros eletrônicos é tratada com ácido benzóico, resultando em sais de nicotina, e apresenta altas concentrações nos dispositivos eletrônicos. A cotinina é vista como um biomarcador de absorção da nicotina e apresenta-se em altos níveis

na saliva de fumantes de e-cigs, assemelhando-se a fumantes de cigarros convencionais, sabese que a nicotina pode suprimir a apoptose e induzir a migração de células, podendo gerar sinais oncogênicos e alterações displásicas em cavidade oral, principalmente com a presença de lesões potencialmente malignas (Clark et al., 2010; Etter, 2014; Gomes et al., 2018; Warren; Singh, 2013; Wisniewski; Ma; Schneider, 2018).

O formaldeído, que é classificado como uma substância cancerígena pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, está presente no vapor dos dispositivos eletrônicos de fumar, estando relacionado à bateria e em alta voltagem. Três ml de solução vaporizada equivalem a inalação de 14mg de formaldeído, enquanto em cigarro convencional, inala-se cerca de 3mg em um maço (Jensen, 2015).

O aquecimento do líquido presente nos dispositivos eletrônicos é de cerca de 65ºC, e em sua composição podem ter propilenoglicol, glicerina, cinamadeído, eugenol, acetilpridina, entre outros componentes. A presença desses agentes químicos pode gerar estresse oxidativo celular, podendo ocasionar alterações em funções endoteliais, contribuindo para evolução de doenças sistêmicas e câncer de boca (Barrington-Trimis; Leventhal, 2018; Chatham-Stephens et al., 2019; Da Silva Machado Barradas et al., 2021; Vargas et al., 2021). Além disso, os e-cig podem levar a danos a cromossomos, mutações genéticas e outras patologias (Chand et al., 2020; Hilton et al., 2020; Sampaio et al., 2022). Adicionalmente, tem sido reportadas alterações moleculares, como redução de antioxidantes endógenos e desregulações genéticas (Briggs; Bell; Breik, 2021; Esteban-Lopez et al., 2022; Guo; Hecht, 2023; Sultan; Jessri; Farah, 2021).

Com o crescente aumento do consumo de e-cig entre jovens e adolescentes, tornou-se cada vez mais prevalente a lesão pulmonar associada ao cigarro eletrônico e vaping (EVALI), quadro de disfunções pulmonares sem associações a outras patologias em usuários de e-cig, diversas alterações bucais são ligadas aos cigarros eletrônico, como danos aos tecidos periodontais aos elementos dentários, alterações na microbiota oral, lesões orais relacionadas a explosão do dispositivo, xerostomia, queimação e irritação da mucosa (Briggs; Bell; Breik, 2021; Esteban-Lopez et al., 2022; Guo; Hecht, 2023; Sultan; Jessri; Farah, 2021).

No periodonto os e-cigs contribuem na patogênese da periodontite, além disso a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal mostrou uma redução significativa quando em contato com e-liquído sabor mentol, também foi observada uma citotoxicidade significativa e apoptose, após 48 horas de exposição aos e-cigs (Sancilio et al., 2016; Sultan; Jessri; Farah, 2021; Sundar et al., 2016; Willershausen et al., 2014).

2.4. SALIVA

A saliva é um líquido transparente aquoso secretado pelas glândulas salivares maiores, chamada de parótida, submandibular e sublingual, além de glândulas menores, com pH neutro entre 6 e 7, em sua composição estão diversos constituintes proteicos e não proteicos, incluindo enzimas, imunoglobulinas, mucinas, potássio, cloro, sódio e bicarbonato (Alves; Severi, 2016; Seeley; Stephens; Tate, 2003; Xie et al., 2013).

A saliva desempenha funções essenciais para a saúde oral e sistêmica, atuando como um fluido biológico complexo que participa de diversos processos fisiológicos. Suas principais funções incluem a lubrificação, facilitando a mastigação e a deglutição por meio da formação do bolo alimentar (Potempa-Jeziorowska et al., 2022); a digestão, ao iniciar a quebra de carboidratos por meio de enzimas, promovendo a absorção de nutrientes (Motamayel, 2009; Potempa-Jeziorowska et al., 2022) a proteção dos tecidos orais contra danos mecânicos, químicos e biológicos, além da manutenção do equilíbrio do pH e da mineralização dentária Clique ou toque aqui para inserir o texto. e a utilidade diagnóstica, uma vez que contém biomarcadores que refletem o estado de saúde sistêmico, permitindo a detecção e o monitoramento de doenças de forma não invasiva (Motamayel, 2009; Potempa-Jeziorowska et al., 2022).

A análise salivar para fins diagnósticos foi proposta algumas décadas atrás e vêm mostrando resultados promissores, visto que as modificações em sua composição podem indicar possíveis biomarcadores para patologias diversas (Castagnola et al., 2011; Lee et al., *[S.d.]*; Rapado-González et al., 2016; Zhang; Sun; Wang, 2012).

Biomarcadores, por sua vez, são definidos como qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido e que influencie ou preveja a incidência de estado de saúde ou doença, podendo ser classificados como marcadores de exposição, efeito e suscetibilidade. (World Health Organization, 2001). Dessa forma, a capacidade de mensurar biomarcadores após a exposição a um agente tóxico, como o tabaco, é de extrema relevância, já que os indivíduos estão expostos à substâncias que levam ao risco aumentado de doenças (WHO - World Health Organization, 2017).

As glândulas salivares são permeáveis e estão em íntimo contato com capilares sanguíneos. Desta forma, na saliva podemos trazer diferentes biomarcadores, como DNA, RNA, microrganismos, anticorpos, proteínas, lipídios etc. As alterações de concentrações, estruturas e funções podem estar relacionadas ao início ou progressão de doenças e, dessa forma, a possibilidade de detecção de alterações de saúde geral e local por meio da saliva deve ser

considerada (Castagnola et al., 2011; Lee et al., *[S.d.]*, *[S.d.]*; Lee; Taneja; Vassallo, 2012; Rathnayake et al., 2017; Zhang; Sun; Wang, 2012).

Diante disso, o diagnóstico e monitoramento por meio de saliva visa o diagnóstico precoce, determinando riscos e auxiliando no tratamento e prognóstico (Dawes; Wes, 1975; Korte; Kinney, 2016; Malamud, 2011; Wilkinson, 2014).

2.5. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Os mediadores inflamatórios que atuam em processos agudos e crônicos, gerando respostas locais e sistêmicas, também desempenham funções importantes no sistema imunológico e nas respostas imunes. As citocinas pró inflamatórias aumentam o processo inflamatório presente e as anti-inflamatórias atuam com a finalidade de diminuí-lo, como em processos de reparo, por exemplo (Graves; Li; Cochran, 2011; Kim; Jenrow; Brown, 2014; Palata et al., 2019; Yoon et al., 2012).

Em cavidade oral, esses mediadores, podem variar em quantidade, tanto no fluído gengival crevicular, quanto em saliva (Bostanci et al., 2020; Chiappin et al., 2007; De Lima, 2003; Hasturk; Kantarci; Van Dyke, 2011; Kinane, 2005; Kumari et al., 2024; Taylor; Preshaw, 2015).

As citocinas são proteínas heterogêneas, que podem modificar o desenvolvimento e comportamento das células, por exemplo, alterando a síntese do RNA e de proteínas celulares. Sua ligação em receptores específicos pode promover atividades como crescimento, diferenciação ou apoptose. Podendo ser pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β, IL-2, e IL-6 ou anti-inflamatórias, que induzem a resposta imunológica humoral (Janeway et al., 2001; Liskmann et al., 2006; Okada; Murakami, 1998; Sheeran; Hall, 1997) No câncer oral, as citocinas encontram-se em desequilíbrio (Bagan et al., 2016; Brailo et al., 2012a; Katakura et al., 2007a; Osman; Costea; Johannessen, 2012; Prasad; McCullough, 2013; Sahebjamee; Atarbashi-Moghadam, 2008; Schapher; Wendler; Gröschl, 2011).

A interleucina-2 (IL-2) tem função de estimular a proliferação e geração de células T (Abbas et al., 2018; Rosenberg, 2014; Smith; Favata; Oroszlan, 1983; Taniguchi; Hiroshi; Takashi, 1983), particularmente para diferenciação de células T auxiliares T 1 (Th1) e efetoras Th2, fornecendo uma vantagem competitiva para células T de memória. (Hoyer, 2008). Ela atua como um fator de crescimento para linfócitos T ativados por antígeno, é crucial para o desenvolvimento, expansão e função das células T reguladoras e desempenha papel na apoptose de células T autorreativas periféricas (Malek, 2003).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina presente em respostas inflamatórias e imunológicas, podendo inibir algumas células e estimular a proliferação de outras, inclusive as células tumorais. Esta é uma citocina multifuncional que desempenha um papel crucial tanto no sistema imunológico quanto em diversos processos fisiológicos. Ela está envolvida na transição entre as respostas imunes inata e adaptativa, influenciando o recrutamento de células imunes para locais de lesão ou infecção. Suas funções vão além da modulação imunológica, incluindo papéis na hematopoiese e no metabolismo(Grebenciucova; VanHaerents, 2023). Além disso, a superexpressão de IL-6 é associada a tumores com o grau histológico avançado e existem evidências de que pacientes com câncer oral e lesões orais potencialmente malignas apresentam níveis maiores de IL-6 na saliva, quando comparados com grupos controle (Chen; Malhotra; Thomasetal, 1999; Fukawa et al., 2023; Hodge; Peng; Cherry, 2005; Mirkeshavarz et al., 2017; Sato; Goto; Murata, 2010; StJohn; Li; ..Zhou, 2004; Wang; Chang; Tai, 2002; Woods et al., 1998).

A interleucina-1 beta (IL-1β) é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Tem função central na resposta imune inata, mediando a inflamação. Além disso, participa de processos patológicos, como doenças autoimunes, cardiovasculares e câncer, contribuindo para a proliferação celular, a angiogênese e a progressão de diversos tumores (Apte; Voronov, 2002; Kaneko et al., 2019; Lopez-Castejon; Brough, 2011; Martinon; Tschopp, 2004). Essa citocina A é capaz de promover a progressão tumoral e a invasão local por meio da ativação de metaloproteinases da matriz (MMPs) e da indução da transição epitélio-mesenquimal (EMT). Níveis elevados de IL-1β estão associados a estágios clínicos avançados, sugerindo sua contribuição para a invasão local e disseminação metastática, por meio da regulação do microambiente tumoral. Em tecidos orais, sua produção encontra-se aumentada em pacientes tabagistas, sendo secretada por queratinócitos e células inflamatórias, o que mantém o microambiente em estado de inflamação crônica e favorece a transformação maligna (Brailo et al., 2012c; Lee et al., 2015; Lopez-Labady; Bologna-Molina; Villarroel-Dorrego, 2021; Tsai et al., 1999).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória fundamental na regulação da resposta imune, sendo importante na manutenção da homeostase imunológica e na prevenção de danos teciduais excessivos durante processos inflamatórios. Alterações nos níveis de IL-10, seja por deficiência ou excesso, estão associadas a doenças autoimunes e inflamatórias. Além disso, a IL-10 pode suprimir respostas imunes, favorecendo a evasão tumoral. No entanto, alguns estudos indicam que a IL-10 também pode estimular a atividade de células T $CD8^+$ e células NK, sugerindo um potencial papel na indução de respostas antitumorais. Desta forma, a

IL-10 pode tanto contribuir para a progressão quanto para a supressão do câncer, dependendo da região (Asadullah et al., 1998; Moore et al., 2001; Saraiva; Vieira; O'Garra, 2020).

No caso do CCE oral, observa-se superexpressão de IL-10 em células tumorais e estromais em aproximadamente 70% das amostras, sendo essa expressão associada a estágios clínicos avançados (T3-T4). Esse padrão sugere um papel da IL-10 na progressão tumoral, possivelmente por favorecer a formação de um microambiente imunossupressor, propício à evasão do sistema imune e à proliferação das células tumorais. Além disso, níveis elevados de IL-10 em pacientes com CCE influenciam negativamente a sobrevida. Quando detectada em estágios iniciais da doença, a IL-10 pode representar um biomarcador promissor para o prognóstico. Sua presença na saliva de pacientes com CCE tem sido associada ao tabagismo, e sua elevação pode suprimir a resposta imune antitumoral, facilitando a progressão do câncer oral em fumantes. Ademais, polimorfismos no gene da IL-10, como o -592 C/A, também estão relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer oral, reforçando a associação entre suscetibilidade à doença e a exposição a fatores de risco como o tabaco (Aziz; Sramkoski; Caligiuri, 2015; Chen et al., 2013; Kuo et al., 2014; Silva et al., 2015).

O fator de necrose tumoral (TNF) desempenha diversas funções biológicas, incluindo a indução da proliferação celular, inflamação, apoptose e imunomodulação. Além disso, estimula a produção de outras citocinas e é secretado por macrófagos, bem como por outras células, como fibroblastos e células endoteliais (Aggarwal; Gupta; Kim, 2012; Aggarwal; Limdi, 2015; Carswell et al., 1075; Epstein Shochet et al., 2017; Sedger; McDermott, 2014; Van Horssen; Ten Hagen; Eggermont, 2006). O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória que atua como um importante mediador da inflamação aguda e crônica. Apresenta efeitos pleiotrópicos, incluindo a indução de apoptose, promoção da angiogênese, modulação da resposta imune e recrutamento de leucócitos para locais de infecção ou lesão (Aggarwal, 2003; Balkwill, 2009; Bradley, 2008).

Além disso, pode exercer efeitos pró-tumorais, contribuindo para a iniciação, promoção e progressão do câncer, por meio da indução de mutações decorrentes do estresse oxidativo e da inflamação persistente (Aggarwal, 2003; Balkwill, 2009; Bradley, 2008). Níveis elevados de TNF-α em pacientes com câncer de boca podem estar associados a maior invasividade tumoral, angiogênese, metástase e pior prognóstico. O tabagismo também se destaca como um importante indutor da produção de TNF-α na mucosa oral, uma vez que a exposição crônica à fumaça está relacionada à sua superexpressão. Cumpre ressaltar que, atua de forma sinérgica com as citocinas IL-1β e IL-6, intensificando o processo inflamatório e podendo contribuir para a resistência ao tratamento em determinados tipos de câncer (Grivennikov; Greten; Karin, 2010; Kim et al., 2010; Krishnan et al., 2014).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é fundamental para a proliferação de células endoteliais e a formação de novos vasos sanguíneos, desempenhando um papel essencial na angiogênese (Azimi-Nezhad, 2014; Liu; Olsen, 2014; Zhou et al., 2021a). Também regula a permeabilidade vascular, o que é crucial para respostas inflamatórias e reparo tecidual (Zhou et al., 2021b).

A proteína α-Klotho chamou atenção há mais de 25 anos, por suas propriedades associadas a antienvelhecimento, é expressa em diversos tecidos, estando presente na membrana celular (Buchanan et al., 2020b; Kuro, 2021; Kuro-o, 2019b; Kuro-O* et al., 1997b; Prud'homme; Wang, 2024a; Tang et al., 2016; Yamazaki et al., 2010). É um regulador multifuncional envolvido no envelhecimento e no metabolismo do cálcio, influenciando saúde cardiovascular e inflamação. Atua como correceptor do FGF23, sendo essencial para a homeostase do fosfato e do cálcio (Prud'homme; Wang, 2024a; Raj; Ahuja, 2024). Além disso, Klotho possui efeitos anti-inflamatórios e antienvelhecimento, inibindo vias inflamatórias, reduzindo inflamação crônica e promovendo longevidade (Bittmann, 2023; Prud'homme; Wang, 2024a).

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de mediadores inflamatórios e proteína Klotho em saliva de pacientes com o hábito de fumar narguilé, cigarros convencionais e cigarros eletrônicos, bem como correlacionar essa expressão com dados clínicos, salivares e de consumo de tabaco.

4. ESCLARECIMENTOS

Os resultados e conclusões provenientes dos objetivos desta tese estão descritos a seguir, nos capítulos 5 e 6, sob a forma de artigos. No capítulo 5, estão descritos os experimentos e análises referentes avaliação de mediadores inflamatórios e proteína Klotho salivar em fumantes de narguilé e cigarros industrializados (Apêndice 1), enquanto no capítulo 6 estão descritos os experimentos e as análises em saliva, referente aos mediadores inflamatórios e a proteína Klotho, de usuários de cigarros eletrônicos(Apêndice 2).

As avaliações que constam no artigo 1 foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes (CAAE: 50462821.0.0000.5497, Número do Parecer: 2.627.150 - Anexo 1) e as avaliações que constam no artigo 2 foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP (CAAE: 36911420.0.0000.0077, Número do Parecer: 4.397.780 - Anexo 2).

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a proposição e condições do trabalho, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Adicionalmente, foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal e responderam questionário sob forma de entrevista, em que foram indagados sobre condição geral de saúde, além de perguntas referentes ao consumo atual do cigarro, idade de início, tipo, quantidade e tempo de uso (Apêndice 3). O teste Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) (Anexo 3) foi utilizado para padrão de consumo de álcool e identifica possíveis problemas relacionados ao uso de bebidas alcoólicas, incluindo uso nocivo e dependência

5. ARTIGO 1

A versão em inglês (Apêndice 2) foi enviada para periódico “JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE” (ISSN: 0904-2512).

AVALIAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E PROTEÍNA KLOTHO SALIVAR EM FUMANTES DE NARGUILÉ E CIGARROS INDUSTRIALIZADOS

Fernanda Rodrigues dos Santos[1], Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel[2], Thayná Stopiello Costa[3], Xabier Marichalar-Mendía[4], Mario Pérez-Sayáns[5], Rodolfo de Paula Vieira[6], Mônica Ghislaine Oliveira Alves[3]*

1 Technology Research Center (NPT), Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil. 2 School of Medicine, Anhembi Morumbi University, Sao Jose´ dos Campos, Brazil. [3]Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

4 Facultad de Medicina y Enfermería. Universidad del País Basco, Leioa, Spain.

5 Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit (Medoralres), Faculty Of Medicine And Dentistry, University Of Santiago de Compostela, Instituto de los Materiales de Santiago de Compostela (Imatus), Santiago, Spain; Instituto De Investigación Sanitaria De Santiago (Idis) (Oralres Group), Santiago De Compostela, Spain. 6 Evangelical University of Goias (Unievangelica), Anápolis – GO, Brazil.

*Correspondence may also be addressed to: Mônica Ghislaine Oliveira Alves
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.
777 Eng. Francisco José Longo Avenue. São José dos Campos, São Paulo, Brazil
Zip code: 12245-000
Phone number: + 55 1239479411/ + 55 12981278200
E-mail: monica.alves@unesp.br

RESUMO

Objetivos: A proposta do presente trabalho é avaliar o perfil da saliva de pacientes tabagistas com o hábito de fumar narguilé e cigarros industrializados, por meio da avaliação de mediadores

da resposta inflamatória e da proteína klotho. Método: A amostra de interesse foi obtida por meio de saliva total constituída por três grupos. O grupo cigarro foi composto por 26 indivíduos fumantes frequentes de cigarros industrializados, exclusivamente. O grupo narguilé foi composto por 33 indivíduos fumantes frequentes de narguilé, exclusivamente. E o grupo controle por 30 indivíduos não-fumantes. A análise dos níveis de IL-02, IL1beta, IL-06, TNF-alfa e VEGF foram realizadas por meio dos kits ELISA R&D DuoSet. O teste de KruskalWallis e teste de comparações múltiplas de Dunn foram usados para calcular a significância nas comparações entre os grupos e análise de correlação de Spearman para examinar a associação de citocinas e os dados clínicos, sendo valor de $p < 0,05$ considerado significativo. Resultados: Observou-se níveis salivares mais elevados em citocinas inflamatórias de IL-2 ($p< 0,0001$), IL6 ($p< 0,0001$), IL1β ($p< 0,0001$), e TNFα ($p< 0,0001$) entre os fumantes, de narguilé e cigarro industrializados, em comparação com o controle. Em relação aos níveis salivares de VEGF ($p< 0,0001$) e Klotho ($p< 0,0001$), observou-se reduzidos na saliva dos fumantes. Em relação às correlações dos níveis salivares e dados clínicos, observou-se apenas correlação negativa estatisticamente significante entre idade e expressão de IL1-beta no grupo narguilé (coeficiente de correlação de Spearman= -0,465183, p -valor=0,0012) e idade e a proteína Klotho no grupo cigarro (coeficiente de correlação de Spearman= -0,4552852, p -valor=0,038). Conclusão: Diante dos resultados, concluímos que pacientes fumantes de narguilé e cigarro convencional apresentam um ambiente salivar pró-inflamatório caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a menor expressão de Klotho na saliva dos fumantes sugere potencial envelhecimento prematuro das células.

Keywords: Saliva. Imunidade Salivar. ELISA. Citocinas. Narguilé. Tabagismo.

INTRODUÇÃO

O tabagismo é visto como uma questão de saúde pública, sendo considerado responsável por 8 milhões de óbitos por ano, além de ser considerado o maior fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias e associado a complicações de doenças crônicas, inclusive em

jovens (INCA – Instituto Nacional de Câncer (Inca/MS), n.d.; PAHO - Pan American Health Organization, 2019; WHO – World Health Organization, 2014, 2021)

O tabaco, em diversas formas de consumo, está relacionado com o desenvolvimento do câncer de boca, sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) o mais prevalente (Brentani; Anelli, 2003; INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017) havendo de 04 a 15 vezes maior risco de desenvolvimento desta neoplasia em indivíduos fumantes (Duarte, 2016; Le Campion et al., 2016), já que contém agentes carcinogênicos, como nitrosaminas e hidrocarboneto policíclico, que em contato com a mucosa oral, e associados com a agressão térmica, geram alterações que favorecem a transformação maligna (INCA, 2018; Thomson, 2013; Vieira; Aguiar; Souza, 2015).

No Brasil, o aumento do consumo de narguilé vem sendo observado, especialmente em indivíduos jovens, pois o uso de aromatizantes e flavorizantes junto ao tabaco torna o produto mais palatável (Araujo, 2016; INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017; Maziak et al., 2015; WHO – World Health Organization, 2011, 2014). Apesar de ser visto por algumas pessoas, principalmente jovens, como menos prejudicial à saúde, com a justificativa de que se utiliza o filtro de água, diversos estudos apontam que o consumo de narguilé é mais prejudicial do que cigarros convencionais. Outra razão para essa crença de menos dano é a frequência de uso mais baixa em relação ao cigarro convencional, o que leva o usuário a acreditar que não é dependente do tabaco (De Araujo, 2016; Souza et al., 2018; WHO – World Health Organization, 2021). De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde, a proporção de usuários versus frequência de consumo revela que 71,8% dos usuários fazem o consume mensal, 25,6% semanal e 2,6% diário (INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017).

A saliva é um fluído aquoso presente na cavidade oral, considerada imprescindível, sendo oriunda das glândulas salivares maiores e menores, composta em cerca de 99% por água, além de compostos orgânicos e inorgânicos, como eletrólitos, enzimas, proteínas e podem variar de indivíduo para indivíduo. Sua composição pode variar de com alterações hormonais, medicamentos e hábitos, como o tabagismo e etilismo (Kaluarachchi et al., 2016b). E há vantagens relacionadas a seu uso como um método de diagnóstico, por ter coleta não invasivo, havendo boa aceitação por parte do paciente(Kaluarachchi et al., 2016b; Navale et al., 2023b).

A imunidade natural, ou inata, é a responsável pela defesa contra micro-organismos e é composta por barreiras físicas e celulares, produzindo resposta por meio de proteínas de fase aguda, citocinas e células (monócitos, macrófagos, granulócitos, linfócitos NK e células dendríticas) sendo capaz de combater infecções e induzir a imunidade adquirida. As citocinas,

que são consideradas substâncias de sinalização, estão presentes na imunidade inata, sendo o ponto de partida para respostas imunes dos linfócitos e antígenos específicos, que têm a característica de permanecer inalterada mesmo diante de encontros sucessivos com o mesmo antígeno (Abbas et al., 2019; Gorczynski & Stanley, 2001; Roitt et al., 2003). Já a imunidade adquirida ou específica é tida como uma resposta humoral (produção de imunoglobulinas), ou por meio da resposta celular ou ativação de células de defesa, essas respostas atuam em conjunto induzindo essas respostas inflamatórias (Abbas, 2019; Roitt et al., 2003). As citocinas são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, capazes de provocar alterações na síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo. Uma citocina produzida durante o curso de uma resposta inflamatória é definida como pró inflamatória e são importantes na indução de respostas das células T helper, que são capazes de gerar diferentes perfis de expressão através de seus subconjuntos, conhecidos como Th1 e Th2, sendo que a resposta de Th1 induz a expressão de IL-2 e IL-12, enquanto Th2 é responsável pela expressão de IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-13, além de estimular uma resposta imunológica humoral (Liskmann et al., 2006; Okada & Murakami, 1998.; Sheeran & Hall, 1997).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de citocinas e proteína klotho salivares de pacientes com o hábito de fumar narguilé e cigarros industrializados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Design do Estudo e Participantes

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Mogi das Cruzes (Número do Parecer: 2.627.150).

A amostra de interesse foi obtida por coleta de saliva total, sendo constituída pelos grupos abaixo:

A. Grupo cigarro: composto por indivíduos fumantes regulares de cigarros industrializados, exclusivamente, no mínimo 10 cigarros por dia, por dois anos.
B. Grupo narguilé: composto por indivíduos fumantes regulares de narguilé, exclusivamente, mínimo duas sessões por semana (Eker et al., 2016), por dois anos (Udayashankar et al., 2021).
C. Grupo não-fumante: foi composto por indivíduos não-fumantes, que não tenham sido fumantes passivos regulares durante toda vida segundo auto declaração.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos, adultos jovens com idade entre 18 e 40 anos, saudáveis, fumantes regulares de narguilé exclusivamente, cigarros industrializados exclusivamente ou não fumantes. E os critérios de exclusão foram: indivíduos com histórico pessoal de neoplasia bucal maligna, com sinais clínicos visíveis de qualquer alteração no local avaliado(Lima et al., 2010), que fazem ingestão semanal de mais que 03 doses de bebidas alcoólicas, usuários de drogas ilícitas e que apresentem alguma doença sistêmica (Udayashankar et al., 2021).

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a proposição e condições do trabalho, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Adicionalmente, foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal e responderam questionário sob forma de entrevista, em que foram indagados sobre condição geral de saúde.

Análise do perfil tabágico

Na análise do perfil tabágico foram incluídas perguntas referentes ao consumo atual do cigarro, idade de início, tipo, quantidade e tempo de uso. Para avaliação de risco pelo uso do álcool, utilizou-se o teste Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) para, sendo composto por 10 questões pontuadas que identificam quatro padrões de consumo de álcool: provável dependência, uso nocivo, uso de risco e uso de baixo risco (Moretti-Pires RO, CorradiWebster CM, 2011).

Avaliação e coleta das salivas dos participantes

Todas as amostras foram coletadas entre as 10:00 e as 12:00 para minimizar variabilidade nos componentes salivares. Para reduzir a contaminação com detritos bucais, foi realizado bochecho com água destilada durante 1 minuto, 10 minutos antes da coleta. As coletas foram realizadas no mínimo 12 horas após consumir álcool e os pacientes foram orientados a não ingerirem quaisquer alimentos, nem realizar escovação dentária, pelo tempo mínimo de duas horas, antes dos procedimentos de coleta da saliva.

Os pacientes permaneceram sentados de forma ereta, em ambiente arejado e calmo, sendo a coleta da saliva realizada de forma não estimulada por meio da expectoração em um tubo plástico descartável (Falcon®, Rio de Janeiro), de acordo com o método modificado de Navazesh (Navazesh et al., 2008). Os pacientes expectoraram 3 mL de saliva nos tubos plásticos imersos em gelo. Após a coleta, os tubos foram hermeticamente fechados, transportados imediatamente até o laboratório e armazenados a -80°C até o momento da análise.

Avaliação do perfil inflamatório através das citocinas

Com as amostras em armazenamento adequado, 1µL de saliva pura homogeneizada foi pipetada em uma placa sólida, a fim de possibilitar as ligações de antígenos e anticorpos. Desta forma, 100 µL/poço da solução de sensibilização aliada ao anticorpo de captura, distribuídos em seis placas para ELISA, as amostras permaneceram em overnight à 4ºC.

A análise dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-02, IL1beta, IL-06, IL-08, TNFalfa), anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-10), bem como dos fatores de crescimento (TGF-beta, VEGF) e da proteína Klotho, foi realizada por meio do teste imunoenzimático (ELISA), utilizando-se kit Human ELISA MAX™ Deluxe BioLegend (BioLegend, Inc, San Diego, USA) e R&D Duoset de acordo com as instruções do fabricante e como o padronizado no Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício da UNIFESP. Para tanto, 100 µL da saliva total de cada paciente foram utilizados para cada mediador avaliado (Brandao-Rangel et al., 2021). As leituras foram realizadas utilizando a plataforma multileitor SpectraMax i3 (Molecular Devices).

Análise Estastística

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 para as análises estatísticas. O teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn foram usados para calcular a significância nas comparações entre os grupos. A análise de correlação por meio de teste de Spearman foi realizado para examinar a associação de citocinas com os dados clínicos e o nível do biomarcador de tabagismo cotinina. O valor de $p \leq 0,05$ e foi considerado significativo.

RESULTADOS

Ao todo, analisou-se 85 amostras, 33 de fumantes de narguilé, 22 de fumantes de cigarro e 30 não fumantes (grupo controle). As informações sobre idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo e escore de risco relacionado ao álcool podem ser encontradas na Tabela 1. Por meio da avaliação com o teste de Kruskal-Wallis, observou-se níveis salivares mais elevados em citocinas inflamatórias de IL-2 ($p< 0,0001$), IL-6 ($p< 0,0001$), IL1β ($p< 0,0001$), e TNFα ($p< 0,0001$) entre os fumantes, de narguilé e cigarro industrializados, em comparação com o controle. Em relação aos níveis salivares de VEGF ($p< 0,0001$) e Klotho ($p< 0,0001$), observouse reduzidos na saliva dos fumantes. A figura 1 mostra a distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e a significância estatísticas avaliadas por meio do teste de comparações múltiplas de Dunn, e tabela 2 a média dos níveis de expressão de cada citocina nos grupos estudados.

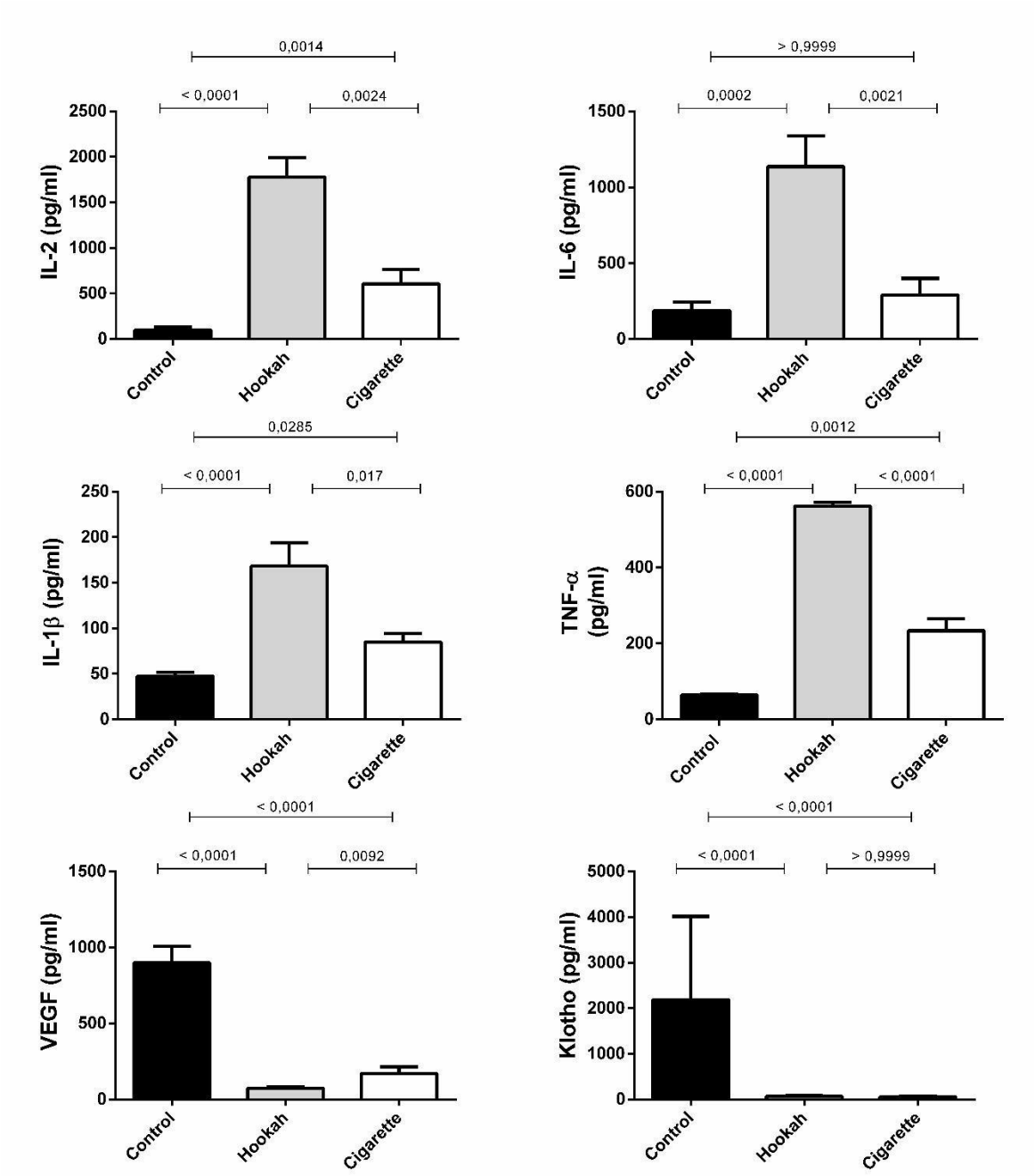


Figura 1. Distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e significância estatísticas das comparações.

Nas tabelas 3, observa-se a correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos por meio do teste de correlação de Spearman, no grupo narguilé e cigarro, respectivamente. Observou-se apenas correlação negativa estatisticamente significante entre idade e expressão de IL1-beta no grupo narguilé (coeficiente de correlação de Spearman=

0,465183, p -valor=0,0012) e idade e a proteína Klotho no grupo cigarro (coeficiente de correlação de Spearman= -0,4552852, p -valor=0,038).

		Grupo Narguilé n=33	Grupo Cigarro n=22	Grupo Controle n=30
Idade (anos)	**Média**	21,18	29	25,6
	Desvio padrão	2,7	5,56	7,16
	Range	18-31	20-38	18-43
Sexo	**Masculino**	9	9	7
	Feminino	24	13	23
Consumo de tabaco	**Média***	5,68	14,59	NA
	Desvio padrão*	5,27	4,99	NA
Anos de consumo de tabaco	**Média***	4	12,00	NA
	Desvio padrão*	1,73	4,74	NA
Pontuação de risco relacionado ao álcool	**Consumo de álcool de baixo risco**	20	16	28
	Consumo de álcool de risco	9	5	2
	Consumo de álcool perigoso	2	1	0
	Provável dependência	2	0	0

NA: Não aplicavél

*Consumo de tabaco para o Grupo do Narguilé = número de sessões por semana e para o Grupo do Cigarro = número de cigarros por dia

Tabela 1. Distribuição da amostra em relação a idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo e escore de risco relacionado ao álcool.

Nível de Proteina (ng/mL)		Grupo Narguilé	Grupo Cigarro	Grupo Controle
IL 2	Média	101,54	1777,97	605,47
	Desvio Padrão	169,78	1214,72	816,51
IL6	Média	189,45	1136,53	290,86
	Desvio Padrão	298,14	1150,36	560,50
IL1 beta	Média	47,38	168,16	84,77
	Desvio Padrão	23,28	141,53	49,38
TNF alfa	Média	64,44	561,96	233,62
	Desvio Padrão	14,09	53,18	158,85
VeGf	Média	916,22	73,95	176,18
	Desvio Padrão	593,10	55,26	225,03
Kloto	Média	2191,01	69,12	58,59
	Desvio Padrão	9827,05	56,75	58,74

Tabela 2. Nível de expressão de cada citocina nos grupos estudados.

			Idade (anos)	Uso de álcoole	Álcool (dose/dia)	Pontuação de risco relacionado ao álcool	Número de sessões por semana	Anos de consumo de tabaco
Hookah group	***IL 2***	Coeficientes de correlação de Spearman p-valor	-0,09270551	0	-0,1533064	0,2038047	0,2342531	0,1384425
			0,6389275	1	0,4360642	0,2982315	0,2302094	0,4823276

	IL6	Coeficientes de correlação de Spearman	0,08002464	-0,3691526	0,0205683	0,088557	-0,1882649	0,07856363
		p-valor	0,6856284	0,053209	0,9172599	0,6540685	0,3373567	0,6910863
	IL1 beta	Coeficientes de correlação de Spearman	-0,02953037	0,2746806	-0,07305782	0,2376803	0,2035771	-0,0133707
		p-valor	0,881421	0,15719	0,7117888	0,2232651	0,2987829	0,9461612
	TNF alfa	Coeficientes de correlação de Spearman	0,1597515	-0,2746806	0,05493718	0,3442647	-0,2311855	-0,01448493
		p-valor	0,4167803	0,15719	0,7812763	0,07282687	0,2365462	0,9416819
	VeGf	Coeficientes de correlação de Spearman	-0,1233314	-0,06867016	-0,1018207	-0,1148467	0,1065294	0,007799577
		p-valor	0,5318076	0,7284322	0,6061592	0,56061	0,5895146	0,9685792
	Kloto	Coeficientes de correlação de Spearman	**-0,465183**	-0,2060669	0,2182265	0,2878841	0,0377976	-0,2197018
		p-valor	**0,01261828**	0,2927842	0,2645887	0,1373998	0,8485606	0,261292
Cigarette group	***IL 2***	Coeficientes de correlação de Spearman	0,2998378	0,3692745	-0,3534203	-0,3354137	0,3990664	0,3415428
		p-valor	0,1866613	0,09946836	0,1160392	0,1482605	0,07312074	0,1296966
	IL6	Coeficientes de correlação de Spearman	0,111012	-0,1744658	0,04225771	0,2393655	-0,3289531	0,100722
		p-valor	0,6919996	0,1040293	0,8810372	0,4064025	0,1739375	0,7222973
	IL1 beta	Coeficientes de correlação de Spearman	0,2705695	0,1477098	0,05743925	-0,02521333	0,3215451	0,2995875
		p-valor	0,2355163	0,5228469	0,8046716	0,9159685	0,1552144	0,1870474
	TNF alfa	Coeficientes de correlação de Spearman	-0,280976	0,01846372	0,006757559	-0,15128	0,02359346	-0,3271206
		p-valor	0,2172803	0,9366852	0,976808	0,5243443	0,919144	0,1477739
	VeGf	Coeficientes de correlação de Spearman	0,01495937	0,2584921	-0,2642206	-0,2055268	-0,02966035	0,1514326
		p-valor	0,9486852	0,2578921	0,2471161	0,3846856	0,8984454	0,5123042
	Kloto	Coeficientes de correlação de Spearman	**-0,4552852**	-0,4246656	0,3973445	0,4133458	-0,0532538	-0,2392766
		p-valor	**0,03808565**	0,05500215	0,07448314	0,07006087	0,8186681	0,2961925

Tabela 3. Correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos e expressão da cotinina por meio do teste de correlação de Spearman nos grupos narguilé e cigarro.

A Figura 2 demonstra a análise da curva ROC para distinguir o grupo Hookah do grupo Controle usando mediadores inflamatórios salivares e dados de expressão da proteína Klotho. Para IL-2: Sensibilidade de 87,5%, especificidade de 83,27% (AUC=0,975 (IC95% 0,946-1); p<0,001). Para IL-6: Sensibilidade de 78,1%, especificidade de 75% (AUC=0,792 (IC95% 0,674-0,910); P<0,001). Para IL1-β: Sensibilidade de 74,2%, especificidade de 96,3% (AUC=:0,898 (IC95% 0,817-0,980); P<0,001). Para TNF-α: Sensibilidade de 100%, especificidade de 100% (AUC=1 (IC95% 1-1); P<0,001). Análise da curva ROC para distinguir o grupo controle do grupo narguilé usando mediadores inflamatórios salivares e dados de expressão da proteína Klotho. Para VEGF: Sensibilidade de 100%, especificidade de 96,9% (AUC=0,998 (IC95% 0,992-1); P<0,001). Para Klotho: Sensibilidade de 89,7%, especificidade de 77,4% (AUC=0,886 (IC95% 0,802-0,970); P<0,001).

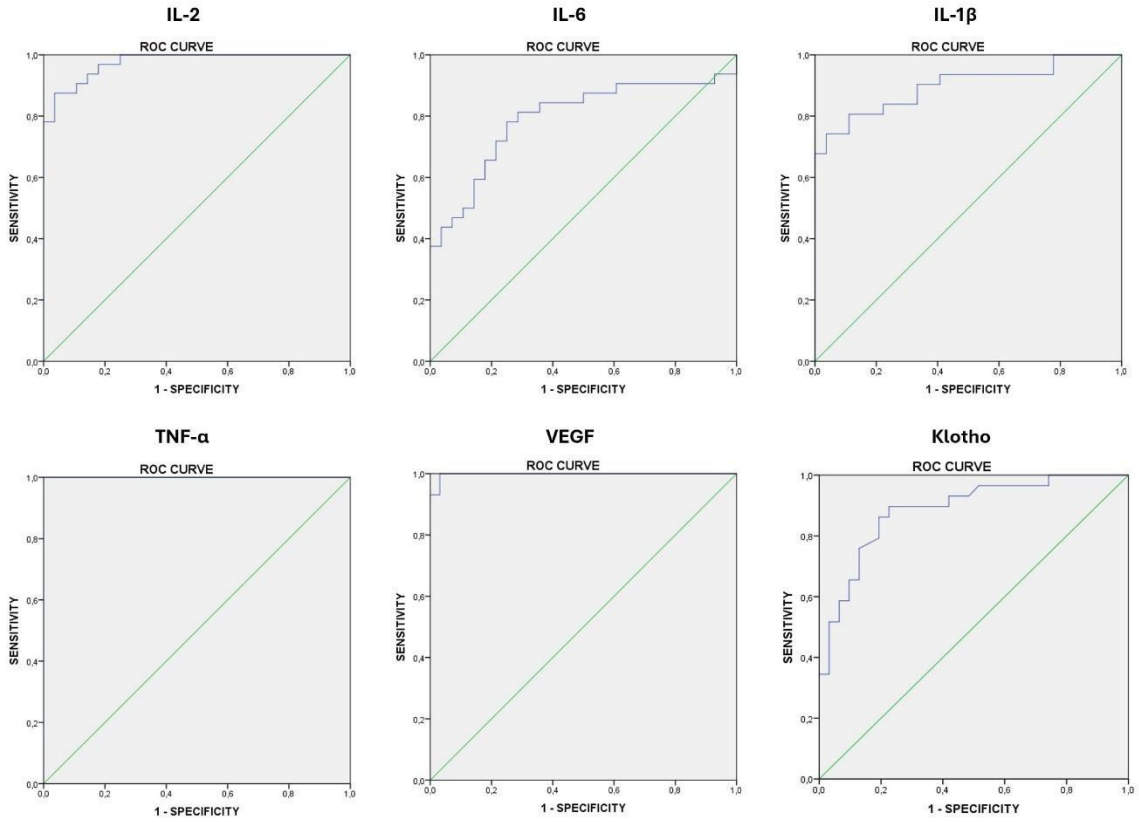


Figura 2. Análise da curva ROC para distinguir o grupo Narguilé do grupo Controle usando mediadores inflamatórios salivares e dados de expressão da proteína Klotho. Para IL-2: Sensibilidade de 87,5%, especificidade de 83,27% (AUC=0,975 (IC95% 0,946-1); p<0,001). Para IL-6: Sensibilidade de 78,1%, especificidade de 75% (AUC=0,792 (IC95% 0,674-0,910); P<0,001). Para IL1-β: Sensibilidade de 74,2%, especificidade de 96,3% (AUC=:0,898 (IC95% 0,817-0,980); P<0,001). Para TNF-α: Sensibilidade de 100%, especificidade de 100% (AUC=1 (IC95% 1-1); P<0,001). Para VEGF: Sensibilidade de 100%, especificidade de 96,9% (AUC=0,998 (IC95% 0,992-1); P<0,001). Para Klotho: Sensibilidade de 89,7%, especificidade de 77,4% (AUC=0,886 (IC95% 0,802-0,970); P<0,001).

DISCUSSÃO

O tabagismo leva à alteração da composição salivar (Simsek Ozek et al., 2016; Sugimoto et al., 2013) e agentes presentes na fumaça produzida pela queima de tabaco são capazes de interagir na cavidade oral ocasionando alterações celulares (Da Silva et al., 2014; Semlali et al., 2011), podendo levar à iniciação e desenvolvimento de doenças, como o câncer oral(Semlali et al., 2011).

A saliva como biópsia líquida é útil na investigação de biomarcadores bioquímicos, imunológicos, genéticos e moleculares, utilizando técnicas genômicas, proteômicas, epigenômicas, microbiômicas e metabolômicas para o estudo de diversas doenças em humanos.

Apesar de algumas limitações, como diferenças de metodologia de amostragem, armazenamento e análise molecular entre os estudos, e necessidade de otimização, padronização e validação das análises, devido à natureza não invasiva, indolor e de fácil de coleta, a saliva pode ser utilizada como uma abordagem alternativa para triagem, diagnóstico precoce, monitoramento pós-tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, por exemplo (Kumar; Gupta; Das, 2024).

No presente estudo, objetivou-se analisar a saliva de pacientes que possuem o hábito de fumar narguilé e cigarros industrializados, por meio da avaliação da expressão de citocinas salivares. Essa avaliação é oportuna, visto que o tabagismo apresenta riscos à saúde (Taati; Arazi; Suzuki, 2020), devido as diversas substâncias tóxicas presentes nos produtos consumidos (INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017), havendo sua relação com a carcinogênese oral (Amer; Waguih; El-Rouby, 2019). Além disso, o consumo de tabaco altera a capacidade de tamponamento salivar (Khemiss; Khelifa; Saad, 2017), está associado a níveis elevados de metais pesados (Khabour et al., 2018) e está associado a alterações genotóxicas (Eker; Koyuncu; Diler, 2016) e epigenéticas teciduais (Sabi et al., 2020). Em relação à dosagem, frequência e método de inalação da fumaça, observa-se variável extensão da exposição a agentes cancerígenos nas diferentes modalidades de tabagismo (Tomar et al., 2019).

Destaca-se que não foram identificados na literatura trabalhos que abordassem essa avaliação específica em usuários dessa modalidade de tabagismo, mostrando relevância cientifica e clínica, sendo a saliva uma amostra biológica promissora, com diversas vantagens em relação a outros materiais como amostras de sangue ou tecidos, visto que sua coleta é considerada simples, conveniente e não-invasiva, além de custos reduzidos ((Fuller et al., 2015; Kong; Birkeland, 2021). Adicionalmente, há significante relação entre a fumaça do cigarro inalada e os componentes constituintes da saliva, visto que é um dos primeiros fluidos biológicos a enfrentar a toxicidade da fumaça inalada, tornando o diagnóstico salivar confiável e consistente (Nagler, 2007).

As citocinas são polipeptídeos solúveis de baixo peso molecular e suas funções incluem participação na inflamação, apoptose, resistência ao hospedeiro e resposta imunológica, tendo atividade desregulada durante processos inflamatórios e de carcinogênese, a ligação de citocinas a receptores específicos nas células pode resultar em várias atividades celulares, como crescimento, diferenciação ou morte celular (Babiuch et al., 2020; Deepthi; Nandan; Kulkarni, 2019; Goldoni et al., 2021; Katakura et al., 2007b).

Mediadores consideradas pró-inflamatórias, como IL-1 beta, IL-2, IL-6, TNFα, podem atuar no crescimento e na proliferação de células imunes e tumorais, além de aumentar a vigilância imunológica. Essas citocinas encontram-se elevadas em saliva de pacientes com câncer oral quando comparadas com grupos controle, podendo ser indicadores sugestivos de transformação maligna, por outro lado, mediadores chamados anti-inflamatórias, como é o caso da VEGF, são neutralizadoras do potencial proliferativos das citocinas pró-inflamatórias.

No presente estudo, avaliou-se saliva de pacientes em processo de carcinogênese por consumo de tabaco, observando-se níveis salivares mais elevados em IL1β, IL-6 e TNFα entre os fumantes, de narguilé e cigarro industrializados, em comparação com o controle.

O tabagismo está associado ao aumento de mediadores pró-inflamatórios no ambiente bucal (Faridoun et al., 2021; Ganesan et al., 2020; Mokeem et al., 2018; Sheth et al., 2018). É importante destacar que, alterações na produção de citocinas induzidas pelo consumo de estimulantes, como o tabaco, a longo prazo, podem alterar imunidade oral facilitando assim a disbiose microbiana (Sheth et al., 2018) Faridoun et al., 2021, Ganesan et al., 2020 e Mokeem et al., 2018 observaram níveis salivares mais elevados de IL-1β, IL-6 e TNF-α em fumantes convencionais de cigarros e de narguilé em comparação com não fumantes. Níveis ainda mais altos de IL-1β e IL-6 em pacientes usuários de cigarros eletrônico foram observados por Faridoun et al., 2021 e de TNF-α porGanesan et al., 2020. E assim como níveis mais elevados de IL-1β, IL-6 e TNF-α em usuários de produtos de tabaco sem fumaça observados por Miluna et al., 2022. E os níveis de TNF-α são potenciais biomarcadores salivares para uma avaliação dos efeitos orais nos usuários de rapé, pó extraído das folhas de tabaco (Muhammad et al.,

2021).

Alqahtani et al., 2019 observaram níveis de IL-6, IL-1β e TNF-α significativamente maiores em fluido sulco peri-implantar em fumantes de cigarros convencionais, eletrônicos e narguilé, quando comparados com níveis de não fumantes. E não relataram diferença estatisticamente significativa nos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias quando comparados indivíduos fumantes de cigarros convencional e narguilé. Entretanto, nos resultados da avaliação dos níveis salivares aqui apresentados, observamos haver maior expressão dessas citocinas na saliva de fumantes de narguilé.

Diversos estudos relatam a relação de níveis mais elevados dessas citocinas em pacientes com câncer oral (Babiuch et al., 2020; Brailo et al., 2012; Duffy et al., 2008; Lee et al., 2018; Lisa Cheng et al., 2014; Panneer Selvam; Sadaksharam, 2015; Singh et al., 2020).

Lee et al., 2018, analisaram de forma comparativa as concentrações de citocinas em plasma e saliva em pacientes com CCE oral em diferentes estágios da doença. Os autores

observaram elevação das citocinas em CCE oral, havendo níveis salivares mais altos de IL-6 e TNFα principalmente em estágios iniciais de CCE oral (I e II) quando comparados com o grupo controle e com o grupo em estágio III e IV. Desta forma, os autores concluíram que a progressão do CCE oral pode ser aumentada pela expressão contínua de citocinas pró-inflamatórias, pró angiogênicas e destacaram que a saliva apresentou maior eficácia diagnóstica em relação ao plasma. Já Babiuch et al., 2020 relataram aumento em IL-6 e TNF-α em amostras de saliva de pacientes com CCE oral em diferentes estágios.

Outros autores, como Panneer Selvam e Sadaksharam (2015) e Lisa Cheng *et al*. (2014), também observaram aumento significativo de IL-6 na saliva de indivíduos acometidos por CCE oral. Enquanto, Singh, Verma e Singh (2020) relatam o aumento de IL-1β em pacientes com CCE oral, quando comparados à pacientes do grupo controle.

Adicionalmente, Duffy et al., 2008, concluíram que os níveis séricos de IL-6 antes do tratamento são um preditor significativo de recorrência e baixa sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Brailo et al., 2012 e Sharma et al., 2011 demonstraram aumento significante de citocinas inflamatórias na saliva no processo de carcinogênese, sugerindo o uso dessa mensuração dessas citocinas salivares no monitoramento da transformação maligna da leucoplasia oral.

Em relação aos níveis salivares de VEGF, no presente estudo, observou-se reduzidos na saliva dos fumantes. Em amostras de plasma, Sgambato et al., 2018 analisaram a expressão de citocinas em tabagistas e os níveis de VEGF estavam elevados nas amostras de plasma.

Argiris et al., 2011 estudaram biomarcadores em soro e tecido de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em estágio avançado (III e IV) e associaram os níveis séricos de VEGF a resposta tumoral, destacando esse como marcador prognóstico potencialmente útil no tratamento contra o câncer de cabeça e pescoço. Kyzas et al., 2005 ; Chuang et al., 2006, e Cheng et al., 2011 associaram VEGF à progressão e prognóstico de CCE orais, observando níveis mais elevados dessa citocina em lesões avançadas. E Shao et al., 2008 observaram correlação significativa entre o nível de VEGF e o sítio do tumor, estágio clínico, acometimento de linfonodos, recorrência e metástases à distância.

Fumar é considerado um importante acelerador do processo de envelhecimento, que envolve complexos mecanismos e diversas patogêneses (Neyra; Hu; Moe, 2021). A proteína Klotho é vista como uma proteína antienvelhecimento, com função anti-inflamatória (Li et al., 2015), e o nível sérico de Klotho diminui com o envelhecimento (Kuro-o, 2019a). Esta proteína está relacionada com a redução da apoptose de células malignas (Elashoff et al., 2012). Incluise

entre seus mecanismos, a sinalização na via do fator de crescimento de fibroblastos e do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina I(Elashoff et al., 2012) .

No presente estudo, os níveis salivares da proteína Klotho foram menores em fumantes, resultado que se alinha com os achados de Wang et al., 2014 e de Krick et al., 2018, em que Klotho foi regulamentado negativamente pela fumaça do cigarro no epitélio das vias aéreas de um modelo murino de DPOC e células epiteliais brônquicas humanas cultivadas.

Verde et al., 2017 destaca a expressão de klotho como um paradoxo. Os autores hipotetizaram que o efeito do envelhecimento causado pelo tabagismo poderia ser mediado por diminuição no fator antienvelhecimento klotho. Contudo, observaram os níveis séricos foram regulados positivamente em fumantes pesados, concluindo que a-klotho atua como molécula anti-inflamatória neste caso seu aumento seria resposta compensatória ao estresse do tabagismo. Em consonância com Yao et al., 2022 demonstraram que o nível sérico de α-Klotho aumentou com aumento no nível sérico de cotinina quando este era ≥130 ng/mL, por outro lado diminuiu quando este era <130 ng/mL. Os autores especularam que este resultado conflitante pode ser um efeito de limiar devido a uma resposta compensatória à exposição ao fumo.

De acordo com Kamizono et al., 2018, cujas descobertas apoiam a conclusão de que cessar o hábito de fumar resultou em uma redução significativa nos níveis séricos de α-klotho, evidenciando um aumento de α-Klotho como uma resposta compensatória ao estresse causado pelo tabagismo.

Como relatado antes, níveis salivares da proteína Klotho foram menores em fumantes de narguilé e de cigarros convencionais comparando-se ao grupo controle. Isso pode ser explicado por nossa amostra ser composta por pacientes jovens, 21,18 e 29 anos, respectivamente, com consumo de tabaco de 5,68 sessões de narguilé por semana e 14,59 cigarros por dia. É importante destacar que, este é o primeiro estudo a avaliar os níveis salivares de a-klotho em fumantes em que não se observava lesão clinicamente.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados, concluímos haver um ambiente salivar pró-inflamatório nos indivíduos tabagistas, com superexpressão das citocinas pró-inflamatórias e subexpressão da anti-inflamatória. Adicionalmente, observou-se menor expressão de Klotho na saliva de fumantes, podendo ser um indicativo do envelhecimento precoce de células em tabagistas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

grant #2018/23248-1 and grant #2012/15165-2, pelo apoio a esta pesquisa.

DECLARATIONS OF INTEREST: none

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. ,. Lichtman, A. H. ,. &. Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ª Ed. ed. *[S.l.]*: Elsevier, 2019.

ABBAS, Abul K. *et al.* **Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospectsSci. Immunol**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://immunology.sciencemag.org/>.

ABRAHAM, Carmela R.; LI, Anne. **Aging-suppressor Klotho: Prospects in diagnostics and therapeutics**. **Ageing Research Reviews**Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2022.

ABRAMOVITZ, Lilach *et al.* KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4254–4266, 1 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-RDC n. 46/2009**.

AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745–756, set. 2003.

AGGARWAL, Bharat B.; GUPTA, Subash C.; KIM, Ji Hye. **Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey**. **Blood**American Society of Hematology, , 19 jan. 2012.

AGGARWAL, Divya; LIMDI, Jimmy K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in

radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 13–19, 11 jan. 2015.

ALMEIDA, D. '. *et al.* **Lesões Pulmonares Associadas ao Uso do Cigarro Eletrônico**. *[S.l.: S.n.]*.

AL-MOMANY, Nairooz H. *et al.* Analysis of Factors That Interrupt With INR Control in the First Anticoagulation Clinic Monitoring Jordanian Patients. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 25, 13 ago. 2019.

ALQAHTANI, Fawaz *et al.* Comparison of cotinine levels in the peri-implant sulcular fluid among cigarette and waterpipe smokers, electronic-cigarette users, and nonsmokers. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, n. 4, p. 702–707, 2019.

ALVES, Kaoane Taynã; SEVERI, Letícia Sarturi Pereira. Componentes salivares associados à prevenção da cárie dental revisão de literatura / Salivary components associated with prevention of dental caries literature review. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo** , 2016.

AMER, Hatem W.; WAGUIH, Hend M.; EL-ROUBY, Dalia H. Development of field cancerization in the clinically normal oral mucosa of shisha smokers. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 17, n. 1, p. 39–45, 2019.

APTE, Ron N.; VORONOV, Elena. Interleukin-1—a major pleiotropic cytokine in tumor–host interactions. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, n. 4, p. 277–290, ago. 2002.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011a.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011b.

ASADULLAH, K. *et al.* IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 783–794, 15 fev. 1998.

AZIMI-NEZHAD, Mohsen. **Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathologyReports of Biochemistry & Molecular Biology**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.RBMB.net>.

AZIZ, S. A.; SRAMKOSKI, R. M.; CALIGIURI, M. A. Elevated IL-10 production by oral cancer cells

induced by tobacco-specific carcinogen: implications for immune evasion. **Tobacco and Cancer**, 2015.

AZIZ, Salman *et al.* Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 7, p. 318–328, 9 ago. 2015.

BABIUCH, Karolina *et al.* Evaluation of proinflammatory, nf-kappab dependent cytokines: Il1α, Il-6, Il-8, and TNF-α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2020.

BAGAN, Leticia *et al.* Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 4, p. 737–743, 1 maio 2016.

BALKWILL, Frances. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 3 maio 2009.

BARRINGTON-TRIMIS, Jessica L.; LEVENTHAL, Adam M. Adolescents' Use of "Pod Mod" ECigarettes — Urgent Concerns. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 12, p. 1099–1102, 20 set.
2018.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021a.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021b.

BATISTA, Bianca G. *et al.* **USO INDISCRIMINADO DO CIGARRO ELETRÔNICO E SEUS MALEFÍCIOS AO TRATO RESPIRATÓRIO**. *[S.l.: S.n.]*.

BEHAR, Rachel Z.; HUA, My; TALBOT, Prue. Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 10 fev. 2015.

BEKLEN, A.; UCKAN, D. Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 25–34, 30 jan. 2021.

BERNARDES-SOUZA, Breno *et al.* Facial-aging mobile apps for smoking prevention in secondary schools in Brazil: Appearance-focused interventional study. **Journal of Medical Internet Research**, v. 20, n. 7, p. 1–18, 2018.

BERTONI, Neilane *et al.* Electronic cigarettes and narghile users in Brazil: Do they differ from cigarettes smokers? **Addictive Behaviors**, v. 98, 1 nov. 2019.

BERTONI, Neilane; SZKLO, André Salém. Electronic nicotine delivery systems in Brazilian state
capitals: Prevalence, profile of use, and implications for the National Tobacco Control Policy. **Cadernos de Saude Publica**, v. 37, n. 7, 2021.

BINSHABAIB, Munerah S. *et al.* Peri-implant clinical and radiographic status and whole salivary cotinine levels among cigarette and waterpipe smokers and never-smokers. **Journal of Oral Science**, v. 60, n. 2, p. 247–252, 1 jun. 2018.

BITTMANN, Stefan. The Role of Klotho in Pediatric Premature Aging Diseases. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 19, n. 3, p. 345–354, 10 jul. 2023.

BLACHMAN-BRAUN, Ruben *et al.* **Hookah, is it really harmless? Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 2014.

BLAKE, David J. *et al.* Soluble extracellular Klotho decreases sensitivity to cigarette smoke induced cell death in human lung epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1647–1652, 1 out. 2015.

BOSTANCI, Nagihan *et al.* Salivary proteotypes of gingivitis tolerance and resilience. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 11, p. 1304–1316, 1 nov. 2020.

BOU FAKHREDDINE, Hisham M.; KANJ, Amjad N.; KANJ, Nadim A. **The growing epidemic of water pipe smoking: Health effects and future needs**. **Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 1 set.
2014.

BOYKAN, Rachel; GONIEWICZ, Maciej L.; MESSINA, Catherine R. Evidence of Nicotine Dependence in Adolescents Who Use Juul and Similar Pod Devices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 12, p. 2135, 17 jun. 2019.

BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 27 jan. 2008.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012a.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012b.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 17, n. 1, p. e10-5, 1 jan. 2012c.

BRANDAO-RANGEL, Maysa Alves Rodrigues *et al.* Pulmonary function changes in older adults
with and without metabolic syndrome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

BRENTANI, Maria Mitzi; ANELLI, Tânia de Fátima Moredo. **Bases da Oncologia**. São Paulo: *[S.n.]*.

BRIGGS, K.; BELL, C.; BREIK, O. **What should every dental health professional know about electronic cigarettes? Australian Dental Journal**John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2021.

BUCHANAN, Nicholas D. *et al.* Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2020a.

BUCHANAN, Sarah *et al.* **Klotho, Aging, and the Failing Kidney**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 27 ago. 2020b.

CAO, Dazhe James *et al.* **Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury**. **Journal of Medical Toxicology**Springer, , 1 jul. 2020.

CARSWELL, E. A. *et al.* **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage) Zymosan (from Saccharomyces cerviiae) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W**. *[S.l.: S.n.]*.

CARVALHO, Bruna Fernandes do Carmo *et al.* Salivary Metabolic Pathway Alterations in Brazilian E-Cigarette Users. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11750, 1 nov. 2024.

CASTAGNOLA, M. *et al.* **Potential applications of human saliva as diagnostic fluid Le potenziali applicazioni della saliva umana come fluido diagnosticoACTA oTorhinolAryngologiCA iTAliCA**. *[S.l.: S.n.]*.

CASTELBLANCO, Esmeralda *et al.* Association of α-klotho with subclinical carotid atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 21, n. 1, p. 207, 11 out. 2022.

CAVALCANTE, Tânia Maria *et al.* Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e percepção de risco no Brasil: Resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. **Cadernos de Saude Publica**, v. 33, p. 1–11, 2017.

CHALON, Stephan *et al.* Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 67, n. 4, p. 391–397, 2000.

CHAND, Hitendra S. *et al.* Pulmonary toxicity and the pathophysiology of electronic cigarette,

or vaping product, use associated lung injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2020.

CHATHAM-STEPHENS, Kevin *et al.* **Morbidity and Mortality Weekly Report Characteristics of Hospitalized and Nonhospitalized Patients in a Nationwide Outbreak of E-cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury-United States, November 2019**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/assets/2019-Lung->.

CHAVES VIEIRA, Ângela; DA SILVA TEIXEIRA AGUIAR, Zildeny; SOUZA, Francielle Vieira. **TABAGISMO E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER BUCAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA SMOKING AND ITS RELATIONSHIP WITH ORAL CANCER: A LITERATURE REVIEW**. *[S.l.: S.n.]*.

CHEN, Chih-Jung *et al.* High expression of interleukin 10 might predict poor prognosis in early

stage oral squamous cell carcinoma patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, p. 25–30, jan. 2013.

CHEN, Z.; MALHOTRA, P. S.; THOMASETAL, G. R. Expressionofpro inflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer,. *In*: **Clinical Cancer Research**. *[S.l.: S.n.]*. v. 5 p. 1369–1379.

CHENG, Shih Jung *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 50–57, 2011.

CHIAPPIN, Silvia *et al.* **Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation**. **Clinica Chimica Acta**, ago. 2007.

CHUANG, Hui Ching *et al.* High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue

cancer. **Laryngoscope**, v. 116, n. 7, p. 1175–1179, jul. 2006.

CICHOŃSKA, Dominika *et al.* Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 22, 12 nov. 2019.

CLARK, Cheryl A. *et al.* Curcumin inhibits carcinogen and nicotine-induced mammalian target

of rapamycin pathway activation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 12, p. 1586–1595, dez. 2010.

DA SILVA, André Luiz Oliveira; MOREIRA, Josino Costa. The ban of eletronic cigarettes in brazil: Success or failure? **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 3013–3024, 1 ago. 2019.

DA SILVA LOPES III, Adair; CORDEIRO BARBOSA FILHO, Valter. **Valter Cordeiro Barbosa Filho I Wagner de Campos II Prevalence of alcohol and tobacco use among Brazilian adolescents: a systematic review Prevalência de consumo de álcool e tabaco entre adolescentes brasileiros: revisão sistemáticaRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

DA SILVA MACHADO BARRADAS, Ariel *et al.* **Os riscos do uso do cigarro eletrônico entre os jovens The risks of using electronic cigarettes among young people Los riesgos de consumir cigarrillos electrónicos entre los jóvenesGlob Clin Res**. *[S.l.: S.n.]*.

DA SILVA, Sandra Tavares *et al.* **Combate ao tabagismo no Brasil: A importância estratégica das ações governamentais**. **Ciencia e Saude Coletiva**, fev. 2014.

DAWES, B. Y. C.; WES, C. D. A. Biology, of 1974). p. 535–548, 1975.

DE ARAUJO, Alberto José. **Perguntas & Respostas: Narguilé ou Cachimbo de água SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**. *[S.l.: S.n.]*.

DE LIMA. delima2003. 2003.

DEEPTHI, G.; NANDAN, S. R. K.; KULKARNI, Pavan G. Salivary tumour necrosis factor-α as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 7, p. 2087–2093, 2019.

DIKOVA, Valentina; JANTUS-LEWINTRE, Eloisa; BAGAN, Jose. Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1658, 13 abr. 2021.

DITTRICH SANTOS, Fabiane *et al.* **São Paulo-BrasilArq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol**. *[S.l.: S.n.]*.

DONATE-CORREA, Javier. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 351, 2015.

DONGIOVANNI, Paola *et al.* **Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation**. **International Journal of Oral Science**Springer Nature, , 1 dez. 2023.

DUARTE, Nathalia Camargo. **Perfil dos pacientes com câncer de boca do Núcleo de Cirurgia de Cabeça e Pescoço HU/UFSC e encaminhados para suporte odontológico no Núcleo de Odontologia Hospitalar HU/UFSC"**. *[S.l.: S.n.]*.

DUFFY, Sonia A. *et al.* Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 750–757, 15 ago. 2008.

EKER, Ebru Derici *et al.* Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 4490–4494, 21 nov. 2016.

EKER, Ebru Derici; KOYUNCU, Hayri; DILER, Songul Budak. Determination of Genotoxic Effects
of Hookah Smoking by Micronucleus and Chromosome Aberration Methods. p. 4490–4494, 2016.

ELASHOFF, David *et al.* Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 4, p. 664–672, abr. 2012.

EL-HAJJ, Maya *et al.* Cigarette and waterpipe smoking are associated with the risk of stroke in Lebanon. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 1, p. 62–70, 2019.

ELISIA, Ingrid *et al.* The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

EPSTEIN SHOCHET, Gali *et al.* Fibroblast paracrine TNF-α signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, 19 jun. 2017.

ESTEBAN-LOPEZ, Maria *et al.* Health effects and known pathology associated with the use of E-cigarettes. **Toxicol Rep.**, p. 1357–1368, 2022.

ETTER, Jean François. Levels of saliva cotinine in electronic cigarette users. **Addiction**, v. 109, n. 5, p. 825–829, 2014.

FARIDOUN, Afnan *et al.* Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: A cross-sectional study. **Oral Diseases**, v. 27, n. 2, p. 277–279, 1 mar. 2021.

FERRARI, Elena *et al.* Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6795, 24 jun. 2021.

FILIPPIDIS, Filippos T. *et al.* Two-year trends and predictors of e-cigarette use in 27 European Union member states. **Tobacco Control**, v. 26, n. 1, p. 98–104, 1 jan. 2017.

FOUNTOULAKIS, Nikolaos *et al.* Reduced Levels of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline in Type 2 Diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 5, p. 2026–2032, 1 maio 2018.

FUKAWA, Yuki *et al.* IL-1 Generated by Oral Squamous Cell Carcinoma Stimulates TumorInduced and RANKL-Induced Osteoclastogenesis: A Possible Mechanism of Bone Resorption Induced by the Infiltration of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v.
24, n. 1, 1 jan. 2023.

FULLER, Colin *et al.* Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: Systematic review with meta-analysis. **Head and Neck**, v. 37, n. 5, p. 755–762, 1 maio 2015.

GANAPATHY, Vengatesh *et al.* Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

GANESAN, Sukirth M. *et al.* **Adverse effects of electronic cigarettes on the disease-naive oral
microbiome**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://advances.sciencemag.org/>.

GLASSER, Allison *et al.* Patterns of E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: Review of the Impact of E-Cigarettes on Cigarette Smoking. 2018.

GLOGAUER, Judah E. *et al.* Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion

through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 11, p. 1218–1226, 1 nov. 2015.

GOERTZEN, Cameron *et al.* **Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasionOncotarget**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.oncotarget.com>.

GOLDONI, Riccardo *et al.* **Malignancies and biosensors: A focus on oral cancer detection through salivary biomarkers**. **Biosensors**MDPI, , 1 out. 2021.

GOMES, Luciana Carneiro *et al.* REVISÃO DE LITERATURA: CÂNCER DE BOCA DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS LITERATURE REVIEW: DIAGNOSTIC MOUTH CANCER AND ASSOCIATED RISK FACTORS. **Revista Interdisciplinar em Saúde, Cajazeiras**, v. 5, n. 4, p. 655–670, 2018.

GORCZYNSKI, R.; STANLEU, J. **Imunologia Clínica**. Rio de Janeiro: Reichmann, 2001.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Critical review in oral biology & medicine: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 143–153, fev. 2011.

GREBENCIUCOVA, Elena; VANHAERENTS, Stephen. **Interleukin 6: at the interface of human health and disease**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media SA, , 2023.

GREENFIELD, Ellen *et al.* Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. **ACS Omega**, v. 8, n. 40, p. 36845–36855, 10 out. 2023.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

GUO, Jiehong; HECHT, Stephen S. DNA damage in human oral cells induced by use of e-cigarettes. **Drug Test Anal**, p. 1189–1197, 2023.

HAMMAL, Fadi *et al.* “Herbal” but potentially hazardous: an analysis of the constituents and smoke emissions of tobacco-free waterpipe products and the air quality in the cafés where they are served. *[S.d.]*.

HAMMOND, David *et al.* USE OF JUUL E-CIGARETTES AMONG YOUTH IN THE UNITED STATES.

2018.

HASTURK, Hatice; KANTARCI, Alpdogan; VAN DYKE, Thomas E. Paradigm shift in the pharmacological management of periodontal diseases. *In*: **Periodontal Disease**. *[S.l.]*: S. Karger AG, 2011. v. 15 p. 160–176.

HELEN, Gideon St *et al.* Nicotine and carcinogen exposure after water pipe smoking in hookah bars. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 2014.

HESS, Catherine Ann *et al.* E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. **Environmental Research**, v. 152, p. 221–225, 1 jan. 2017.

HILTON, Robert *et al.* **E-cigarettes and Vaping Associated Lung Injury: A Case Series and Brief Review**. **American Journal of the Medical Sciences**Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

HO, Ming Yi *et al.* TNF-α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3β-dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 1109–1119, ago. 2012.

HODGE, D. R.; PENG, B.; CHERRY, J. C. "Interleukin6supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter meth ylation. **Cancer Research**, v. 65, p. 4673–4682, 2005.

HOYER, Katrina K. et al. **Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease**. *[S.l.: S.n.]*.

HUSSAIN, S. Perwez; HARRIS, Curtis C. **Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials**. **International Journal of Cancer**, 1 dez. 2007.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: smokeless tobacco and some tobacco-specific nitrosamines.** Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol89/mono89.pdf.>.

INCA. Causas e prevenção. **Instituto Nacional de Câncer**, p. 1–6, 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tabagismo: Dados Numéricos**. . Acesso em: 31 mar. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Centro colaborador da OPAS/OMS sobre o controle do tabaco**. . Acesso em: 4 abr. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **legisladores Uso de narguilé : efeitos sobre a saúde , necessidades de pesquisa**. *[S.l.: S.n.]*.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). **Programa Nacional de Controle do Tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Prevalência do tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Convenção-Quadro sobre Controle do Uso do Tabaco (CQCT)**.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Cigarros Eletronicos - O que Sabemos?**

INVERNIZZI, Giovanni. **Persistence of systemic inflammation in COPD in spite of smoking cessation La persistenza dell'infiammazione nella BPCO nonostante la cessazione dal fumo**. *[S.l.: S.n.]*.

JACOBS, Merel *et al.* IL-10 producing regulatory B cells are decreased in blood from smokers and COPD patients. **Respiratory Research**, v. 23, n. 1, p. 287, 17 out. 2022.

JANEWAY, Charles A. *et al.* O sistema imunológico na saúde e na doença. *In*: **Imunobiologia**. *[S.l.: S.n.]*.

JENSEN, R. P. Integration of Acid–Base and Electrolyte Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 389–392, 22 jan. 2015.

JI, Eoon Hye *et al.* E-cigarette aerosols induce unfolded protein response in normal human oral keratinocytes. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 27, p. 6915–6924, 2019.

JIA, Shiyu *et al.* **Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>.

JITĂREANU, Alexandra *et al.* Electronic Cigarettes' Toxicity: From Periodontal Disease to Oral Cancer. **Applied Sciences**, v. 11, n. 20, p. 9742, 19 out. 2021.

JURETIĆ, M. *et al.* **Short Communication Salivary Levels of TNF-α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions)Folia Biologica (Praha)**. *[S.l.: S.n.]*.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023– 2043, 1 out. 2016a.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023– 2043, 1 out. 2016b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018a.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018c.

KANEKO, Naoe *et al.* The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration**, v. 39, n. 1, p. 12, 6 dez. 2019.

KASSEM, Nada O. F. *et al.* Urinary NNAL in hookah smokers and non-smokers after attending a hookah social event in a hookah lounge or a private home. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 74–82, 1 out. 2017.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATARINA GUSTAFSSON. **Imperial Tobacco concorda em adquirir a unidade de cigarros eletrônicos da Dragonite**.

KHABOUR, Omar F. *et al.* Plasma and saliva levels of three metals in waterpipe smokers: a case control study. **Inhalation Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 224–228, 2018.

KHEMISS, Mehdi; KHELIFA, Mohamed Ben; SAAD, Helmi Ben. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow rate and consistency in relation to waterpipe tobacco smoking. **Libyan Journal of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 4–11, 2017.

KIM, J. J. *et al.* TNF-α-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1
and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420–1434, 5 set. 2010.

KIM, Jae Ho; JENROW, Kenneth A.; BROWN, Stephen L. **Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials**. **Radiation Oncology Journal**Department of Radiation Oncology, , 1 set. 2014.

KINANE. kinane2005. 2005.

KLUMB, Claudete E.; CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo B. **Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóidesRev.bras.hematol.hemoter**. *[S.l.: S.n.]*.

KONG, Lingyi; BIRKELAND, Andrew C. cancers Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: Current State and Future Challenges. 2021.

KORTE, Dina L.; KINNEY, Janet. Personalized medicine: An update of salivary biomarkers for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 26–37, 2016.

KOSMIDER, Leon *et al.* Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine

solvent and battery output voltage. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 16, n. 10, p. 1319–1326, 1 out. 2014.

KRICK, Stefanie *et al.* Fibroblast growth factor 23 and Klotho contribute to airway inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 1, 1 jul. 2018.

KRISHNAN, Rajkumar *et al.* Association of Serum and Salivary Tumor Necrosis Factor-α with Histological Grading in Oral Cancer and its Role in Differentiating Premalignant and Malignant Oral Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7141–7148, 15 set. 2014.

KUMAR, Prabhat; GUPTA, Shilpi; DAS, Bhudev C. Saliva as a potential non-invasive liquid biopsy for early and easy diagnosis/prognosis of head and neck cancer. **Translational Oncology**, v. 40, 1 fev. 2024.

KUMARI, Swati *et al.* **A Review on Saliva-Based Health Diagnostics: Biomarker Selection and Future Directions**. **Biomedical Materials and Devices**Springer Nature, , 1 mar. 2024.

KUNTIC, Ivana *et al.* The role of acrolein for E-cigarette vapour condensate mediated activation of NADPH oxidase in cultured endothelial cells and macrophages. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 475, n. 7, p. 807–821, 7 jul. 2023.

KUO, Wu-Hsien *et al.* Effects of interleukin-10 polymorphisms and smoking on the risk of gastric cancer in Taiwan. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 5, p. 967–71, 2014.

KURO, Makoto. **Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing**. **Clinical Science**Portland Press Ltd, , 1 ago. 2021.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019a.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019b.

KUROSU, Hiroshi *et al.* Physiology: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 16 set. 2005.

KYZAS, Panayiotis A. *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 2, p. 170–177, jun. 2005.

LAFFER, Björn *et al.* Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 9 out. 2019.

LE CAMPION, Anna Carolina Omena Vasconcellos *et al.* Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 178–184, 2016.

LEE, Chia-Huei *et al.* Interleukin-1 beta transactivates epidermal growth factor receptor via the CXCL1-CXCR2 axis in oral cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38866–38880, 17 nov. 2015.

LEE, J. M. *et al.* **Salivary diagnostics**. *[S.l.: S.n.]*.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. **Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms**. **Journal of Dental Research**, fev. 2012.

LEE, L. T. *et al.* Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 6, p. 699–707, 1 jun. 2018.

LEE, Peter N.; COOMBS, Katharine J.; AFOLALU, Esther F. Considerations related to vaping as a possible gateway into cigarette smoking: an analytical review. **F1000Research**, v. 7, p. 1915, 22 jul. 2019.

LEE, Shin Hwa; CHOI, Yung Hyun. Link between Periodontal Disease and Cancer: A Recent Research Trend. **Journal of Life Science**, v. 23, n. 4, p. 602–608, 30 abr. 2013.

LEE, Yu-Hsiang *et al.* **Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases**. *[S.l.: S.n.]*.

LI, Lingling *et al.* Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extract-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27890–27900, 13 nov. 2015.

LIMA, Celina Faig *et al.* Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 441–446, 2010.

LIN, X. *et al.* VEGF mediated signaling in oral cancer. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 62, n. 14, p. 64–68, 30 dez. 2016.

LISA CHENG, Yi-Shing *et al.* Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 956–965, jul. 2014.

LISKMANN, Stanislav *et al.* Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 21, n. 4, p. 543–550, jul. 2006.

LIU, Yanqiu; OLSEN, Bjorn R. Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 363–368, 4 out. 2014.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–95, ago. 2011.

LOPEZ-LABADY, Jeaneth; BOLOGNA-MOLINA, Ronell; VILLARROEL-DORREGO, Mariana. Expression of Interleukin-1ß and Interleukin-8 in Oral Potentially Malignant Disorders and Carcinomas.
Frontiers in Oral Health, v. 2, 10 set. 2021.

MA, Chuanwei *et al.* Prevalence and trends in tobacco use among adolescents aged 13–15 years in 143 countries, 1999–2018: findings from the Global Youth Tobacco Surveys. **The Lancet Child and Adolescent Health**, v. 5, n. 4, p. 245–255, 1 abr. 2021.

MALAMUD, Daniel. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–178, 2011.

MALEK, Thomas R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 6, p. 961–965, 1 dez. 2003.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Mudanças no uso do tabaco entre adolescentes brasileiros e fatores associados: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 29, n. 9, 2024.

MARTINON, Fabio; TSCHOPP, Jürg. Inflammatory Caspases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561–574, maio 2004.

MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. **Tobacco Control**, v. 24, p. i3–i12, 2015.

MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. *[S.d.]*.

MENEZES, Ana M. B. *et al.* **Mental health problems and smoking among adolescents from Southern BrazilRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.scielo.br/rsp>.

MENEZES, Ana Maria Baptista *et al.* Frequência do uso de narguilé em adultos e sua distribuição conforme características sociodemográficas, moradia urbana ou rural e unidades federativas: Pesquisa nacional de saúde (PNS), 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 57–67, 2015.

MIHAILA, Romeo Gabriel; TODOR, Samuel Bogdan. **Bridging Periodontal Disease and Myeloproliferative Neoplasms: The Role of Immune Dysregulation and Inflammatory Mediators**. , 12 nov. 2024.

MILUNA, Sintija *et al.* The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. **Dentistry Journal**, v. 10, n. 8, 1 ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Stella Martins. . **Quero parar de usar o cigarro eletrônico,**

o que fazer?

MIRBOLOUK, Mohammadhassan *et al.* Prevalence and distribution of e-cigarette use among U.S. adults: Behavioral risk factor surveillance system, 2016. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 7, p. 429–438, 2 out. 2018.

MIRKESHAVARZ, M. *et al.* Interleukin-6 secreted by oral cancer- associated fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 6, n. 10, p. 131–136, 2017.

MISHRA, Aseem *et al.* **Harmful effects of nicotine**. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 mar. 2015.

MODELING, Lagrangian Method *et al.* No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. **Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics**, v. 26, n. 3, p. 1–4, 2019.

MOKEEM, Sameer A. *et al.* Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 38–43, 1 jul. 2018.

MOORE, Kevin W. *et al.* Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, abr. 2001.

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. . *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br,>.

MORETTI-PIRES, Rodrigo Otávio; CORRADI-WEBSTER, Clarissa Mendonça. Adaptação e validação do Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) para população ribeirinha do interior da Amazônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 497–509, mar. 2011.

MOTAMAYEL, A. Saliva as a mirror of the body health. **Dentistry**, p. 1–6, 2009.

MUHAMMAD, Waqar *et al.* Article assessment of unstimulated whole salivary tumor necrosis

factor alpha (Tnf-α) and cellular micronuclei levels in snuff (naswar) users and non-users for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, 2 jul. 2021.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NAGLER, R. M. Altered salivary profile in heavy smokers and its possible connection to oral cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 22, n. 4, p. 274–280, 2007.

NAIK, Pooja; CUCULLO, Luca. **Pathobiology of tobacco smoking and neurovascular disorders: Untied strings and alternative products**. **Fluids and Barriers of the CNS**BioMed Central Ltd., , 31 out. 2015.

NATTO, Suzan; BALJOON, Mostafa; BERGSTRÖM, Jan. Tobacco smoking and periodontal bone

height in a Saudi Arabian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 9, p. 1000–1006, set.

2005.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023a.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023b.

NAVAZESH, Mahvash; KUMAR, Satish K. S. Measuring salivary flow. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 35S-40S, maio 2008.

NEYRA, Javier A.; HU, Ming Chang; MOE, Orson W. **Klotho in clinical nephrology: Diagnostic and therapeutic implications**. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**American Society of Nephrology, , 1 jan. 2021.

NG, Marie *et al.* Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012.

JAMA, v. 311, n. 2, p. 183–192, 8 jan. 2014.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Vaping Devices (Electronic Cigarettes) DrugFacts**.

O'CONNELL, Grant; GRAFF, Donald W.; D'RUIZ, Carl D. Reductions in biomarkers of exposure (BoE) to harmful or potentially harmful constituents (HPHCs) following partial or complete substitution of cigarettes with electronic cigarettes in adult smokers. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 6, p. 443–454, 23 jul. 2016.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OLIVEIRA ALVES, Mônica Ghislaine *et al.* Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. 298–305, 1 set. 2020.

OLIVEIRA, Max Moura de *et al.* Características da Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar - PeNSE. **Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 605–616, 1 jul. 2017.

OLIVEIRA-CAMPOS, Maryane *et al.* Risk and protection factors for chronic noncommunicable diseases in adolescents in Brazilian capitals. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

OPAS/OMS. **Tabaco**.

OSMAN, Tarig A.; COSTEA, Daniela E.; JOHANNESSEN, Anne C. **The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma: A review of the literature**. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, maio 2012.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Folha Informativa Tabaco**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5641:folhainformativa-tabaco&Itemid=1097>.

PAHO/OPAS. **Medidas urgentes são necessárias para proteger as crianças e os jovens dos cigarros eletrônicos**.

PALATA, Ondrej *et al.* **Radiotherapy in combination with cytokine treatment**. **Frontiers in Oncology**Frontiers Media S.A., , 2019.

PANATTO, D. *et al.* **Tobacco smoking among students in an urban area in Northern ItalyJ prev med hyg**. *[S.l.: S.n.]*.

PANNEER SELVAM, Niranzena; SADAKSHARAM, Jayachandran. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 236–241, 1 set. 2015.

PATEL, JayendrakumarB *et al.* Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 447, 2016.

PATIL, Shankargouda *et al.* Proteomic Changes in Oral Keratinocytes Chronically Exposed to Shisha (Water Pipe). **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 23, n. 2, p. 86–97, 1 fev. 2019a.

PATIL, Shankargouda *et al.* **The relationship of "shisha" (water pipe) smoking to the risk of head and neck cancer**. **Journal of Oral Pathology and Medicine**Blackwell Publishing Ltd, , 1 abr. 2019b.

PATIL, Shankargouda *et al.* Multiomic analysis of oral keratinocytes chronically exposed to shisha. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 284–289, 1 abr. 2019c.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019. *[S.d.]*.

POTEMPA-JEZIOROWSKA, Magdalena *et al.* Saliva and its value as a diagnostic material. **Pediatria i Medycyna Rodzinna**, v. 18, n. 1, p. 34–39, 31 maio 2022.

PRASAD, Gareema; MCCULLOUGH, Michael. Chemokines and cytokines as salivary biomarkers for the early diagnosis of oral Cancer. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging. **Cells**, v. 13, n. 17, p. 1413, 24 ago. 2024a.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. **Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging**. **Cells**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2024b.

QASIM, Hanan *et al.* Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 9, 22 set. 2017.

QASIM, Hanan *et al.* **The effects of hookah/waterpipe smoking on general health and the cardiovascular system**. **Environmental Health and Preventive Medicine**BioMed Central Ltd., , 14 set. 2019.

RAJ, Sonali; AHUJA, Mehak. The versatility of klotho protein: insights into its multifaceted functions in health and disease. **World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research**, p. 12–17, 5 jun. 2024.

RAPADO-GONZÁLEZ, Óscar *et al.* **Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 12 set. 2016.

RATHNAYAKE, Nilminie *et al.* Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 7, 20 jan. 2017.

RODRÍGUEZ-RABASSA, Mary *et al.* Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, 7 nov. 2018.

ROITT, I. ;.; BROSTOFF, J. ;.; MALE, D. **Imunologia**. 6a Ed. ed. São Paulo: Manole, 2003.

ROSENBERG, Steven A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 15 jun. 2014.

RUBINSTEIN, Mark L. *et al.* **Adolescent Exposure to Toxic Volatile Organic Chemicals From E-Cigarettes**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/>.

SABI, Salsabeel H. *et al.* Changes at global and site-specific DNA methylation of MLH1 gene

promoter induced by waterpipe smoking in blood lymphocytes and oral epithelial cells. **Inhalation Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 124–130, 2020.

SAHEBJAMEE, Mahnaz; ATARBASHI-MOGHADAM, Fazele. **Salivary concentration of TNFα, IL1α, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma Article in Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal** ·. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v13i5/medoralv13i5p292.pdf>.

SAMPAIO, Andréia dos Santos Silva *et al.* Perfil do paciente jovem com câncer de boca: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e29511830934, 19 jun. 2022.

SANCILIO, Silvia *et al.* Cytotoxicity and apoptosis induction by e-cigarette fluids in human gingival fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 3, p. 477–483, 1 abr. 2016.

SANTOS, Ubiratan Paula. Cigarro eletrônico--repaginação e renovação da indústria do tabagismo. **J Bras Pneumol**, v. 44, n. 5, p. 345–346, 2018.

SARAIVA, Margarida; VIEIRA, Paulo; O'GARRA, Anne. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.

SATO, J.; GOTO, J.; MURATA, T. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamouscellcarcinoma. **"OralSurg ery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 3, p. 330–336, 2010.

SCHAPHER, Mirco; WENDLER, Olaf; GRÖSCHL, Michael. **Salivary cytokines in cell proliferation and cancer**. **Clinica Chimica Acta**, 18 set. 2011.

SCHERR, Andreas *et al.* Airway reactivity to mannitol is similarly increased in chronic cigarette

and water pipe smokers. **International Journal of COPD**, v. 13, p. 157–163, 2018.

SCHLAUCH, Robert C. *et al.* The moderating effect of family involvement on substance use risk factors in adolescents with severe emotional and behavioral challenges. **Addictive Behaviors**, v. 38, n. 7, p. 2333–2342, jul. 2013.

SEDGER, Lisa M.; MCDERMOTT, Michael F. **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell**

death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2014.

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. **Anatomia & Fisiologia**. 6ª Edição ed. *[S.l.]*: Lusociência, 2003.

SEMLALI, A. *et al.* Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 5, p. 533–541, out. 2011.

SEPULVEDA INOSTROZA, EA *et al.* Evaluation of micronuclei, cytomorphometric and cytologic

changes of the oral mucosa in hookah and cigarette smokers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 137, n. 6, p. 640–650, jun. 2024.

SERAPINAS, Danielius *et al.* **Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status Infiammazione sistemica nella BPCO in rapporto alla condizione tabagica**. *[S.l.: S.n.]*.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018a.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018b.

SHAO, Zhe *et al.* Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with the angiogenesis and clinical outcome. **Oral Oncology**, v. 44, n. 12, p. 1110–1117, dez.
2008.

SHARMA, Mohit *et al.* Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 15, n. 5, p. 705–714, out. 2011.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. **Cytokines in anaesthesia Characteristics of cytokines (modified from Molloy, Mannick and Rodrick 86 and Abbas, Lichtman and Pober 1)British Journal of**

Anaesthesia. *[S.l.: S.n.]*.

SHETH, Chirag C. *et al.* Modulation of salivary cytokines in response to alcohol, tobacco and caffeine consumption: a pilot study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

SHIELDS, Peter G. *et al.* Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. **EBioMedicine**, v. 60, p. 102982, out. 2020.

SHIHADEH, Alan *et al.* Toxicant content, physical properties and biological activity of waterpipe tobacco smoke and its tobacco-free alternatives. **Tobacco Control**, v. 24, p. i22–i30, 1 mar. 2015.

SHIPLO, Samantha; CZOLI, Christine D.; HAMMOND, David. E-cigarette use in Canada: Prevalence and patterns of use in a regulated market. **BMJ Open**, v. 5, n. 8, 2015.

SIEGEL, Michael B.; TANWAR, Kerry L.; WOOD, Kathleen S. Electronic cigarettes as a smoking-
cessation tool: Results from an online survey. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 40, n. 4, p. 472–475, abr. 2011.

SILVA, T. A. *et al.* Increased expression of IL-10 in tumor-associated macrophages is related to advanced clinical stages of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, p. 903–909, 2015.

SIMSEK OZEK, N. *et al.* Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 13, p. 1472–1478, 1 dez. 2016.

SINGH, Prerana; VERMA, Jitendra K.; SINGH, Jayant Kumar. Validation of Salivary Markers, IL1β, IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

SINGH, Prithvi Kumar *et al.* Genetic polymorphism of interleukin-10 (-A592C) among oral cancer with squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 18–22, maio 2017.

SIRAVEGNA, Giulia *et al.* **Integrating liquid biopsies into the management of cancer**. **Nature Reviews Clinical Oncology**Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

SMITH, K. A.; FAVATA, M. F.; OROSZLAN, F. Production and characterization of monoclonal antibodies to human interleukin 2: strategy and tactics. **J Immunol**, 1983.

SOARES, Tatiana de Abreu Braga. **Cigarro e outras formas de tabaco: investigação de conhecimento, atitudes e percepção de risco em estudantes de medicina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental)—*[S.l.]*: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

SONEJI, Samir *et al.* **Association between initial use of e-cigarettes and subsequent cigarette smoking among adolescents and young adults a systematic review and meta-analysis**. **JAMA Pediatrics**American Medical Association, , 1 ago. 2017.

SOUZA, Miriam; SZKLO, Andre; DE ALMEIDA, Liz Maria. Impact of the reduction of smoking prevalence on the trend of lung cancer mortality in Brazil. Tobacco Induced Diseases. **Brazilian National Cancer Institute, Epidemiology Division, Brazil**, v. 16, p. 591, 2018.

ST. HELEN, Gideon *et al.* Nicotine and Carcinogen Exposure after Water Pipe Smoking in Hookah Bars. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 1 jun. 2014.

STATE FACT SHEETS. **Smoking & Tobacco Use** .

STJOHN, M. A.; LI, Y.; ..ZHOU. Interleukin6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology**, v. 130, n. 8, p. 929–935, 2004.

STRZELAK, Agnieszka *et al.* **Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**MDPI AG, , 21 maio 2018.

SUGIMOTO, Shinya *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associatedwith staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 8, p. 1645–1655, abr. 2013.

SULTAN, Ahmed S.; JESSRI, Maryam; FARAH, Camile S. Electronic nicotine delivery systems: Oral health implications and oral cancer risk. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 50, n. 3, p. 316–322, 1 mar. 2021.

SUN, Zhongwei *et al.* Effect of interleukin-1β and tumor necrosis factor α gene silencing on mouse gastric cancer cell proliferation and migration. **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2559–2565, 1 abr. 2016.

SUNDAR, Isaac K. *et al.* E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77196–77204, 22 nov. 2016.

SWENSON, Wade G.; WUERTZ, Beverly R. K.; ONDREY, Frank G. Tobacco carcinogen mediated
up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 9, p. 668–679, set. 2011.

szklo2011. *[S.d.]*.

TAATI, Behzad; ARAZI, Hamid; SUZUKI, Katsuhiko. **Oxidative stress and inflammation induced by waterpipe tobacco smoking despite possible protective effects of exercise training: A review of the literature**. **Antioxidants**MDPI, , 1 set. 2020.

TABRIZI, Reza *et al.* Hookah Smoking: A Potentially Risk Factor for First-Ever Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 10, 1 out. 2020.

TANG, Anqi *et al.* **Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 2023.

TANG, X. *et al.* Expression of klotho and β-catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. **Diseases of the Esophagus**, v. 29, n. 3, p. 207– 214, 1 abr. 2016.

TANIGUCHI, T.; HIROSHI, M.; TAKASHI, F. Structure and expression of a cloned cDNA for uman
inlerleukin-2. **nature**, 1983.

TAYLOR, John J.; PRESHAW, Philip M. **Gingival crevicular fluid and saliva**. *[S.l.: S.n.]*.

THOMSON, P. **Lesões pré-malignas da boca: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: *[S.n.]*.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. A brief outline of the immune system. **Methods in Molecular Biology**, v. 1184, p. 3–12, 2014.

TORREY, Christine M. *et al.* Waterpipe cafes in Baltimore, Maryland: Carbon monoxide, particulate matter, and nicotine exposure. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 405–410, 19 jul. 2015.

TSAI, C. C. *et al.* Interleukin-1 beta in oral submucous fibrosis, verrucous hyperplasia and squamous cell carcinoma tissues. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 15, n. 9, p. 513–9, set.
1999.

UCHIDA, Hitoshi; OVITT, Catherine E. Novel impacts of saliva with regard to oral health. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 127, n. 3, p. 383–391, mar. 2022.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and
diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. **Journal of Cytology**, v. 33, n. 3, p. 125–129, 1 jul. 2016.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and
diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. v. 33, n. 3, p. 125–129, 2021.

URRUTIA-PEREIRA, M. *et al.* Youth tobacco use in Latin America: What is the real extent of the problem? **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 4, p. 328–335, 2019.

VAN HORSSEN, Remco; TEN HAGEN, Timo L. M.; EGGERMONT, Alexander M. M. **TNF-α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility Learning ObjectivesThe Oncologist**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.TheOncologist.com>.

VARGAS, Luana Soares *et al.* Riscos do uso alternativo do cigarro eletrônico: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 30, p. e8135, 20 jul. 2021.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p.

53–57, 1 fev. 2017a.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p. 53–57, 1 fev. 2017b.

VEZINA, P.; MCGEHEE, D. S.; GREEN, W. N. **Exposure to nicotine and sensitization of nicotine-induced behaviors**. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 15 nov. 2007.

VIEIRA, Ângela Chaves; AGUIAR, Zildeny da Silva Teixeira; SOUZA, Francielli Vieira. Tabagismo e sua relação com o câncer bucal: uma revisão de literatura. **Revista Bionorte**, v. 4, n. 2, p. 9–18, 2015.

WANG, Qihui *et al.* Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 427, p. 79–85, 1 jan. 2014.

WANG, Y. F.; CHANG, S. Y.; TAI, S. K. "Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 recep tor expressions in oral squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 24, n. 9, p. 850–858, 2002.

WARD, Kenneth D. **The waterpipe: An emerging global epidemic in need of action**. **Tobacco Control**BMJ Publishing Group, , 1 mar. 2015.

WARREN, Graham; SINGH, Anurag. Nicotine and lung cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v. 12, 1 jan. 2013.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **United Nations high-level meeting on noncommunicable disease prevention and control.**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/ bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies**.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco. n. May 2020, p. 1–8, 2021.

WILKINSON, Emma. Earlier cancer diagnosis would reduce NHS costs. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 12, p. e529, 2014.

WILLERSHAUSEN, Ines *et al.* Influence of E-smoking liquids on human periodontal ligament fibroblasts. **Head and Face Medicine**, v. 10, n. 1, 15 set. 2014.

WISNIEWSKI, Brett T. *et al.* Toxicity and infectivity: insights from de novo prion formation. **Current Genetics**, v. 64, n. 1, p. 117–123, 30 fev. 2018.

WISNIEWSKI, David J.; MA, Tao; SCHNEIDER, Abraham. Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. **Experimental Cell Research**, v. 370, n. 2, p. 343–352, 15 set. 2018.

WOLF, I. *et al.* Klotho: A tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094–7105, 27 nov. 2008.

WOODS, K. V. *et al.* Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens . **Cancer Research**, v. 58, n. 14, p. 3132–3141, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. *[S.l.: S.n.]*.

XIE, Biao *et al.* **Klotho acts as a tumor suppressor in cancers**. **Pathology and Oncology Research**, out. 2013.

YAMAZAKI, Yuji *et al.* Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, jul. 2010.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings

from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022a.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings

from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022b.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. 2020.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. *[S.d.]*.

YOON, Angela J. *et al.* Inflammatory biomarkers in saliva: Assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 5, p. 434–440, maio 2012.

YORK, Autumn G. *et al.* IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. **Nature**, v. 627, n. 8004, p. 628–635, 21 mar. 2024.

ZHANG, Aihua; SUN, Hui; WANG, Xijun. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1718–1727, nov. 2012.

ZHOU, Juan *et al.* Serum β-klotho is a potential biomarker in the prediction of clinical outcomes among patients with NSCLC. **Journal of Thoracic Disease**, v. 13, n. 5, p. 3137–3150, 1 maio 2021a.

ZHOU, Yan *et al.* The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 24 ago. 2021b.

6. ARTIGO 2

INFLAMMATORY MEDIATORS AND KLOTHO PROTEIN IN E-CIG USERS SALIVA

Fernanda Rodrigues dos Santos[1], Bruna Fernandes do Carmo Carvalho[2], Natália de Carvalho Faria[2], Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel[3], Janete Dias Almeida[2], Andre Luis Lacerda Bachi[4], Rodolfo de Paula Vieira[5,6], Mônica Ghislaine Oliveira Alves[2]*

1 Technology Research Center (NPT), Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil.

[2]Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Câmpus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

3 School of Medicine, Anhembi Morumbi University, Sao José dos Campos, Brazil [4]University of Santo Amaro (UNISA), Rua Isabel Schmidt 349, São Paulo, Brazil.

[5]Evangelical Univesrsity of Goiás (Unievangélica), Anápolis, Brazil.

6 Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), Sao José dos Campos, Brazil.

*Correspondence may also be addressed to: Mônica Ghislaine Oliveira Alves

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Câmpus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

777 Eng. Francisco José Longo Avenue. São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Zip code: 12245-000

Phone number: + 55 1239479411/ + 55 12981278200

E-mail: monica.alves@unesp.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de mediadores inflamatórios e proteína Klotho na saliva de usuários de cigarros eletrônicos (e-cig), bem como correlacionar essa expressão com dados clínicos, salivares e de consumo do dispositivo. O grupo cigarro eletrônico

(Grupo E-cig) foi composto por 25 indivíduos usuários regulares e exclusivos de ecig, há pelo menos 6 meses, e o grupo controle foi composto por 25 indivíduos não-fumantes e/ou usuários de e-cig. Ambos sem alterações clínicas visíveis em mucosa bucal. Foram obtidos dados clínicos dos participantes, além de informações específicas sobre seus hábitos de consumo de álcool e tabaco. Os testes imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados utilizandose kit Human ELISA MAX™ Deluxe BioLegend para análise dos níveis de citocinas próinflamatórias (IL-02, IL-06, TNF-alfa), anti-inflamatórias (IL-10), bem como dos fatores de crescimento (TGF-beta, VEGF) e da proteína Klotho. Os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney e correlação de Spearman, com significância $p \leq 0,05$. Observou-se diferença estatísticamente significativa em todos os mediadores estudados, com aumento da expressão em usuários de e-cig em IL-2 (p-valor < 0,0001), IL-6 (p-valor < 0,0001), TNF (p-valor = 0,02) e VEGF (p-valor < 0,0001), e redução da expressão em IL10 (p-valor < 0,0001) e KLOTHO (p-valor = 0,01). Observou-se correlação positiva estatisticamente significante entre período de consumo do cigarro eletrônico (anos) e expressão de IL-6 (coeficiente de correlação de Spearman= 0,42; p -valor= 0,03), entre uso simultâneo de cigarro eletrônico e álcool e expressão de TNF (coeficiente de correlação de Spearman= 0,47; p -valor= 0,02) e entre tempo para cada sessão (minutos) e expressão de IL10 (coeficiente de correlação de Spearman= 0,43; p -valor= 0,02). O aumento da expressão dos mediadores inflamatórios IL-2, IL-6, TNF, VEGF e redução da IL-10 no grupo E-cig demonstram ambiente salivar com características próinflamatórias. Adicionalmente, a redução da expressão de proteína Klotho sugere um potencial envelhecimento prematuro das células. Essas alterações podem estar associadas a inflamação crônica, envelhecimento celular precoce e maior risco para doenças periodontais e
malignas.

Keywords: Saliva, Citocinas, Proteínas Klotho, Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina, Cigarro Eletrônico, E-Cig, Tabagismo.

INTRODUÇÃO

Os Sistemas eletrônicos de liberação de nicotina ou cigarros eletrônicos (e-cigs) foram inicialmente comercializados pela Imperial Tobacco Group, após a compra da patente do modelo desenvolvido pelo chinês Hon Lik, com objetivo inicial de substituir os cigarros industrializados, visando reduzir os danos à saúde e como método auxiliar para cessar o hábito

tabágico (Bertoni & Szklo, 2021; Katarina Gustafsson, 2013; State Fact Sheets, 2022). Entretanto, o uso desses dispositivos pode persistir por anos, não sendo potencialmente um auxílio nos esforços para parar de fumar (Behar et al., 2015; Ganapathy et al., 2017).

Os e-cigs são compostos por bateria, atomizador e cartucho que é abastecido por líquido saborizado, em geral, a base de nicotina. Quando o dispositivo é acionado, a bateria realiza o aquecimento do líquido, em uma temperatura estimada de 350ºC, que se transforma em vapor e é inalado pelo usuário. A temperatura elevada durante a inalação é capaz de gerar alterações químicas e físicas nos compostos dos líquidos, aumentando sua toxicidade (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2019; Kosmider et al., 2014). Vários sintomas estão associados ao uso contínuo de cigarros eletrônicos, como dispnéia, tosse, cefaléia, vertigem e infecções em boca e orofaringe (Barufaldi et al., 2021; Cao et al., 2020; Da Silva & Moreira, 2019).

No Brasil, desde o ano de 2009 por meio da portaria RDC 46 28/08/2009 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ratificada em 2024, fica proibida a propaganda, comercialização e utilização de e-cig. Todavia, o comércio ilegal persiste, impulsionado por um elevado nível de consumo e impactando diretamente as políticas públicas de saúde (Barufaldi et al., 2021; Cao et al., 2020; Da Silva & Moreira, 2019).

É importante destacar que, o uso de tabaco em indivíduos adultos vem passando por uma redução considerável em todo o mundo, porém, o nicotinismo entre adolescentes e jovens adultos é observado como um problema em ascensão em âmbito mundial. No Brasil, segundo o Global Youth Tobacco Survey 2009 (GYTS), o uso dos produtos de tabaco já é frequente entre estudantes de 13 a 15 anos (Cavalcante et al., 2017; Glasser et al., 2018; Oliveira-Campos et al., 2018; Soneji et al., 2017; Bertoni & Szklo, 2021; Ma et al., 2021; Malta et al., 2018; Ng et al., 2014; Szklo,2011). Segundo a OMS, o uso de cigarros eletrônicos entre crianças de 13 a 15 anos é muito maior do que o uso por adultos e vêm crescendo em um ritmo alarmante em todo o mundo (PAHO/OPAS, 2023).

A avaliação salivar vem se apresentando como uma ferramenta de estudo e diagnóstico não-invasiva, e pode ser empregada para detecção de células e marcadores, sendo rápida, simples, de baixo custo e com boa aceitação dos pacientes. A saliva é um fluído presente na cavidade oral, composta por água e compostos orgânicos e inorgânicos, como proteínas, enzimas e eletrólitos, sendo sua composição alterada por questões hormonais, medicamentos e hábitos, como tabagismo e etilismo (Jia et al., 2017; Kaluarachchi et al., 2016; Navale et al., 2023; Rapado-González et al., 2016; Siravegna et al., 2017).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão de mediadores inflamatórios e proteína Klotho na saliva de usuários de e-cig, bem como correlacionar essa expressão com dados clínicos, salivares e de consumo dos dispositivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos (CEPH) do ICT-UNESP (CAAE: 36911420.0.0000.0077, número do parecer: 4.397.780). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram submetidos a exame clínico extra e intrabucal.

O tamanho amostral foi definido com base nos parâmetros estatísticos estabelecidos por Ye et al., 2020. O grupo de usuários de cigarro eletrônico (Grupo E-cig) foi composto por 25 indivíduos adultos, usuários regulares e exclusivos de e-cig, há pelo menos 6 meses, sem alterações clínicas visíveis em mucosa bucal. O grupo controle (Grupo Controle) foi composto por 25 indivíduos não-fumantes e não usuários de e-cig, sem alterações clínicas visíveis em mucosa, pareados por sexo e idade ao Grupo E-cig. Não foram incluídos na amostra pacientes com doenças autoimunes e histórico de tratamento oncológico cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico em qualquer órgão ou sistema. Além de fumantes duais (usuários simultâneos de cigarro industrializado e e-cig), nem pacientes com histórico de tratamento prévio para doenças autoimunes.

Os participantes do presente trabalho fazem parte da mesma coorte apresentada por Carvalho et al., 2024. Assim, as características epidemiológicas (idade, sexo, raça/cor da pele autodeclarada, escolaridade), exame físico (frequência cardíaca, glicemia capilar, oximetria, concentração de monóxido de carbono), variáveis salivares (sialometria, pH, viscosidade, concentração de cotinina), consumo de álcool (escore AUDIT, tipos e quantidade de bebidas) e o uso de e-cigs (tempo e frequência de uso, volume vaporizado, concentração de nicotina, uso concomitante com álcool), foram previamente descritas em detalhe na publicação anterior do nosso grupo Carvalho et al., 2024.

Para coleta da saliva, os pacientes foram orientados a não realizar escovação dentária ou ingerir quaisquer alimentos 2 horas antes da coleta e deveriam estar há 12 horas sem ingerir álcool. Com objetivo de reduzir a contaminação com detritos bucais, 10 minutos antes das coletas, os pacientes realizaram um bochecho com água destilada, por 1 minuto (Oliveira Alves et al., 2020). Coletou-se saliva não estimulada, em ambiente calmo e sem interrupções, durante 5 minutos, e a sialometria (mL/min) foi calculada frente a razão da quantidade de saliva obtida

em mL, dividida por 5 minutos (Navazesh & Kumar, 2008). A saliva coletada foi armazenada imediatamente em freezer -80°C.

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados utilizando-se kit Human ELISA MAX™ Deluxe BioLegend (BioLegend, Inc, San Diego, USA) para análise dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Interleucina 02 - IL-02, Interleucina 06 - IL-06, Tumor Necrosis Factor alfa - TNF-alfa), anti-inflamatórias (Interleucina 10 - IL-10), bem como dos fatores de crescimento (TGF-beta, VEGF) e da proteína Klotho, de acordo com as instruções do fabricante. Utilizando-se 100 µL da saliva total de cada paciente para cada mediador avaliado (Brandao-Rangel et al., 2024). As leituras foram realizadas utilizando a plataforma multileitor SpectraMax i3 (Molecular Devices).

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e comparados por meio do teste de Mann-Whitney, considerando como significante valor de $p \leq 0,05$. Utilizou-se a análise de correlação de Spearman para examinar a associação entre a expressão dos mediadores e os dados clínicos coletados.

RESULTADOS

Foram analisadas 50 amostras de saliva, sendo 25 provenientes de usuários regulares e exclusivos de e-cig, e 25 de indivíduos não fumantes (grupo controle).

A figura 1 mostra a distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e a significância estatísticas das comparações. Observou-se diferença estatisticamente significativa em todos os mediadores estudados. Havendo aumento da expressão em usuários de e-cig em IL2 (p-valor < 0,0001), IL-6 (p-valor < 0,0001), TNF (p-valor = 0,02) e VEGF (pvalor < 0,0001), e redução da expressão em usúarios de e-cig em KLOTHO (p-valor = 0,01) e IL-10 (p-valor < 0,0001).

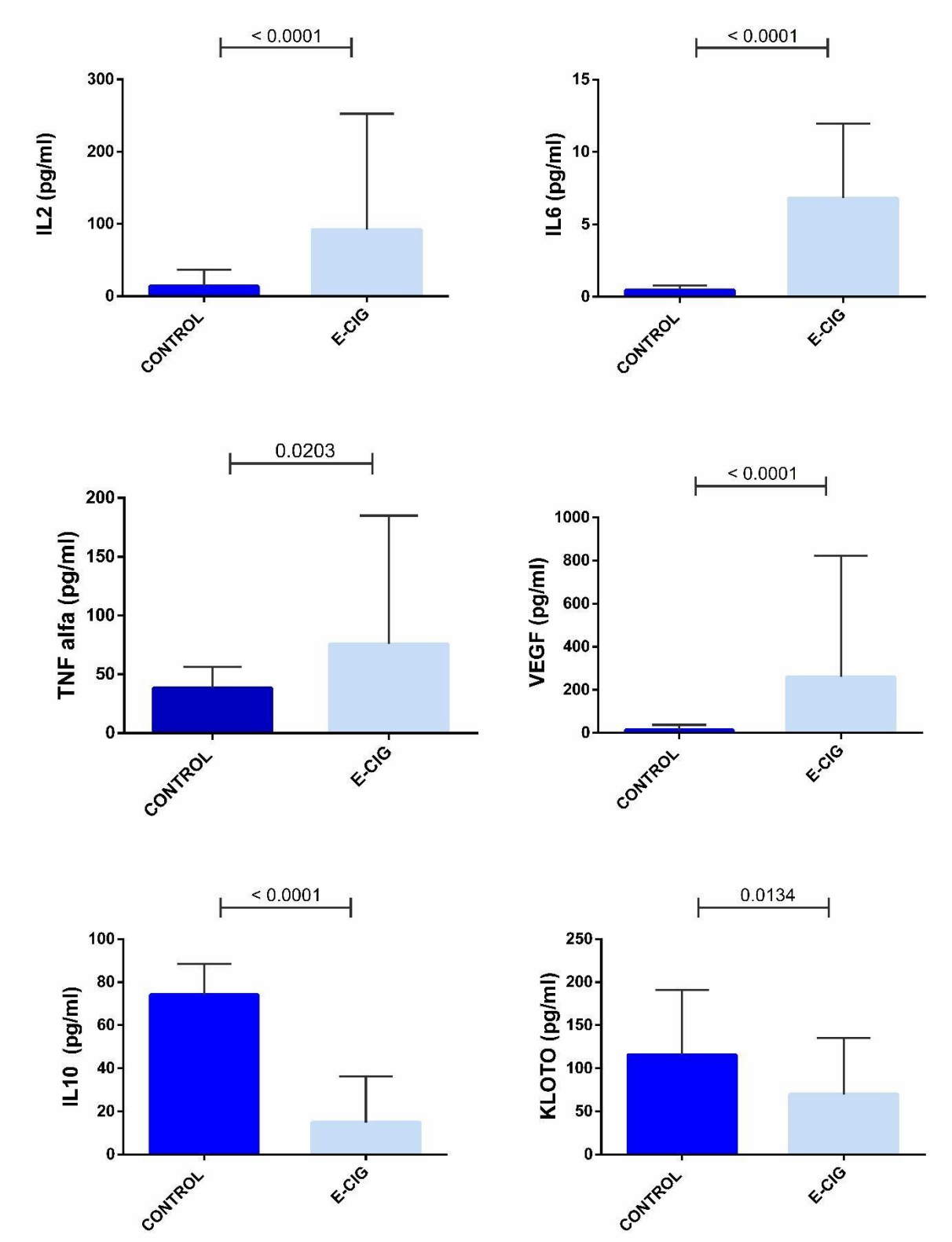


Figura 1. Distribuição da expressão das citocinas estudadas em cada grupo e significância estatísticas das comparações.

Na tabela 1, observa-se a correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos por meio do teste de correlação de Spearman, no grupo e-cig. Observou-se

correlação positiva estatisticamente significante entre período de consumo do cigarro eletrônico (anos) e expressão de IL-6 (coeficiente de correlação de Spearman= 0,42; p -valor= 0,03), entre uso simultâneo de cigarro eletrônico e álcool e expressão de TNF (coeficiente de correlação de Spearman= 0,47; p -valor= 0,02) e entre tempo para cada sessão (minutos) e expressão de IL10 (coeficiente de correlação de Spearman= 0,43; p -valor= 0,02).

		Age	Duration of Electronic Cigarette Use (years)	Frequency of Electronic Cigarette Use per Week	Number of Sessions per Day	Duration per Session (minutes)	Amount of E-liquid per Day (ml)	Amount of Nicotine per Day (ml)	Alcohol-Related Risk	Alcohol Intake per Day	Simultaneous Use of Ecigarettes and Alcohol	Increase in Ecigarette Use with Alcohol Consumption
IL2	Spearman Correlation Coefficient	0,057	-0,014	-0,059	-0,054	0,169	-0,220	0,120	0,392	0,235	0,065	-0,376
	p-value	0,787	0,948	0,779	0,798	0,419	0,364	0,615	0,078	0,306	0,768	0,066
IL6	Spearman Correlation Coefficient	0,313	0,429	0,257	0,246	-0,168	0,417	-0,308	-0,015	-0,117	0,282	0,097
	p-value	0,128	**0,032***	0,216	0,236	0,422	0,096	0,187	0,948	0,612	0,192	0,721
TNF	Spearman Correlation Coefficient	0,131	0,012	-0,025	-0,274	-0,204	-0,072	0,049	-0,283	0,276	0,480	-0,314
	p-value	0,534	0,955	0,904	0,185	0,327	0,742	0,837	0,213	0,227	**0,020***	0,115
VEGF	Spearman Correlation Coefficient	-0,075	0,361	0,208	0,170	-0,353	0,251	-0,250	-0,082	-0,087	0,133	0,078
	p-value	0,722	0,077	0,319	0,418	0,083	0,329	0,287	0,723	0,706	0,547	0,776
KLOTO	Spearman Correlation Coefficient	-0,027	-0,190	0,248	0,157	-0,164	0,395	0,124	0,241	-0,105	0,207	0,146
	p-value	0,898	0,364	0,232	0,453	0,433	0,117	0,601	0,293	0,651	0,344	0,590
IL10	Spearman Correlation Coefficient	0,194	0,143	0,005	-0,044	0,436	0,026	0,097	0,103	-0,359	0,135	0,136
	p-value	0,352	0,497	0,981	0,834	**0,029***	0,922	0,686	0,658	0,110	0,539	0,615

Tabela 1. Correlação entre a expressão das citocinas estudadas e os achados clínicos por meio e de expressão da cotinina. do teste de correlação de Spearman no grupo e-cig

DISCUSSÃO

Os efeitos do tabagismo sobre a composição salivar já foram amplamente descritos na literatura, inclusive em indivíduos após a cessação do hábito. Além disso, a exposição da mucosa oral à fumaça do tabaco pode provocar alterações celulares relevantes, potencialmente associadas ao desenvolvimento de neoplasias, como o câncer bucal e orofaringe (Da Silva & Moreira, 2019; Semlali et al., 2011; Simsek Ozek et al., 2016; Sugimoto et al., 2013). Além de alterações no perfil do metaboloma salivar (Greenfield et al., 2023).

O presente estudo analisou os níveis de citocinas inflamatórias e da proteína Klotho na saliva de usuários de e-cig. Ainda que o tamanho amostral possa ser considerado uma limitação do trabalho, a análise de mediadores pró-inflamatórios se mostrou aumentada e significantes no Grupo E-cig. Esses resultados são consistentes com achados de estudo prévio realizado por nosso grupo, o qual demonstrou alterações em metabólitos associados a processos inflamatórios (Carvalho et al., 2024). Adicionalmente, a pesquisa reforça os potenciais danos dos cigarros eletrônicos à saúde oral e sistêmica, sugerindo a necessidade de monitoramento clínico e estratégias preventivas para minimizar seus impactos. É válido destacar que não foram

encontrados trabalhos contendo a avaliação da proteína Klotho na saliva deste grupo de participantes.

A inflamação crônica causada por agentes químicos está relacionada a carcinogênese, já que substâncias como citocinas, radicais livres, prostaglandinas e fatores de crescimento agem em tecidos cronicamente inflamados, induzindo alterações genéticas e epigenéticas em vias responsáveis por manter a homeostase, como mutações pontuais em genes supressores de tumores, metilação de DNA e modificações pós-traducionais (Hussain & Harris, 2007).

O hábito de consumir apresenta riscos à saúde, incluindo disfunções endoteliais frequentemente associadas a doenças cardiovasculares. Esses efeitos podem ocorrer devido à exposição a agentes presentes nos solventes do vapor dos cigarros eletrônicos, como acroleína, formaldeído e acetaldeído, que podem induzir apoptose em células endoteliais, além de causar estresse oxidativo e inflamação (Buchanan et al., 2020; Qasim et al., 2017).

A acroleína também é capaz de interferir na oxidação de proteínas reguladoras e em processos oxidativos em células endoteliais, podendo ocasionar na disfunção e morte celular (Szadkowski & Myers, 2008). O formaldeído é classificado como agente cancerígeno e pode gerar alterações no sistema cardiovascular (Buchanan et al., 2020; Cichońska et al., 2019; Lee et al., 2019; Lisa Cheng et al., 2014). Adicionalmente, a presença dos aromatizantes foi descrita como capaz de diminuir a ação antimicrobiana na saliva dos usuários, por meio da inibição de lisozima e imunoglobulina A (Cichońska et al., 2019; Lee et al., 2019).

É importante destacar que, o tabagismo crônico está associado a um estado de inflamação sistêmica (Invernizzi, 2011; Serapinas et al., 2010), e essa desregulação do equilíbrio inflamatório pode contribuir para presença de doenças periodontais e aumentar o risco de progressão para condições malignas (S. H. Lee & Choi, 2013; Mihaila & Todor, 2024).

Os flavorizantes utilizados nos e-cigs, também chamados de e-líquidos, demonstraram um nível elevado de citotoxicidade. Estes líquidos tem como base o propilenoglicol e a glicerina vegetal, que são considerados compostos são citotóxicos (Beklen & Uckan, 2021), e ainda, estão associados com aumento de estresse oxidativo (Ji et al., 2019) e com a liberação de mediadores pró- inflamatórios, como prostaglandina-E2 e ciclooxigenase-2 (Sundar et al., 2016). (Ye et al., 2020), observaram que quando expostos à essas substâncias, os fibroblastos periodontais exibiram nível elevado de estresse oxidativo e apoptose.

A nicotina, presente em grandes quantidades nestes líquidos, é capaz de influenciar no desenvolvimento da carcinogênese (Sugimoto et al., 2013; Jităreanu et al., 2021), estando associada a ativação de receptores de fatores de crescimento epidérmico e aumento da migração celular em queratinócitos orais displásicos (Wisniewski et al., 2018).

As citocinas são polipeptídeos solúveis de baixo peso molecular, com importante papel na regulação de respostas inflamatórias e imunes, podendo induzir respostas em níveis genômicos e sendo desreguladas em processos inflamatórios e carcinogênicos (Babiuch et al., 2020; Deepthi et al., 2019).

As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, INF-γ e TNF-α) atuam na proliferação celular e na transição epitelial-mesenquimal, favorecendo o crescimento de células imunes e tumorais, aumentando a vigilância imunológica e aparecendo de forma aumentada em saliva de pacientes com câncer oral em relação a pacientes saudáveis. Já as citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e VEGF) são capazes de neutralizar o potencial de proliferação de citocinas pró-inflamatórias (Aziz et al., 2015; Dikova et al., 2021; Ferrari et al., 2021).

Como referido anteriormente, observando níveis salivares mais elevados de IL-2, IL-6, TNF-α e VEGF em comparação ao grupo controle. Estudos mostram níveis elevados de IL-6 e TNF-α em fumantes de diferentes modalidades, como cigarros industrializados e cigarros eletrônicos (Faridoun et al., 2021; Ganesan et al., 2020; Miluna et al., 2022; Mokeem et al., 2018).

Nossos resultados estão em consonância com os de Binshabaib et al., 2018, que identificaram níveis mais altos de IL-6 e TNF-α em amostras de fluído crevivular gingival de usuários de cigarro eletrônico. Adicionalmente TNF-α permanece elevado em ex-fumantes, indicando inflamação contínua (Serapinas et al., 2010). Esses mediadores inflamatórios também foram elevados em saliva de pacientes com lesões com potencial de transformação maligna, câncer oral (Babiuch et al., 2020; Lee et al., 2019; Lisa Cheng et al., 2014) e em metástases em linfonodos de cabeça e pescoço (Dikova et al., 2021).

A correlação positiva entre níveis salivares mais elevados de IL-6 e períodos mais longos de consumo de cigarros eletrônicos pode ser explicada pela resposta inflamatória desencadeada por cigarros eletrônicos contendo nicotina. (Boss et al., 2024), em revisão exploratória, observaram que o uso prolongado de e-cig contendo nicotina resultou em níveis elevados de IL-6 em 60% dos casos e sugeriram que a exposição prolongada aos estímulos inflamatórios dos dispositivos pode levar a aumentos sustentados da citocina. Assim como (K. P. Singh et al., 2019) concluíram que o aumento dos níveis de IL-6 e outras citocinas em plasma estavam relacionada a resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelos constituintes do vapor do cigarro eletrônico. Os autores destacam que, embora haja correlação entre os níveis de IL-6 e o uso de cigarros eletrônicos, é importante considerar que pode haver variabilidade individual na resposta à exposição, além da variação relacionada a frequência e marca utilizada.

O TNF-α é um mediador pró-inflamatório presente em câncer oral, associado à invasão celular, ativação inflamatória e progressão do carcinoma de células escamosas (Glogauer et al., 2015; Goertzen et al., 2018), estando seu aumento ligado à maior proliferação celular, enquanto sua ausência pode indicar inibição da proliferação e migração (Ho et al., 2012; Sun et al., 2016). Além disso, é considerado um biomarcador relevante para o diagnóstico precoce e monitoramento do câncer oral (Brailo et al., 2012; Juretić et al., 2013).

Observou-se correlação positiva entre níveis salivares elevados de TNF-α e o uso concomitante de cigarro eletrônico e álcool. Essa associação pode ser atribuída ao fato de que ambas as substâncias estão relacionadas à indução de respostas inflamatórias no organismo, uma vez que o consumo de álcool está associado ao aumento da inflamação sistêmica (González-Reimers, 2014). Dessa forma, o uso simultâneo dessas substâncias pode intensificar a resposta inflamatória. Ademais, indivíduos que utilizam cigarros eletrônicos tendem a apresentar padrões de consumo de álcool de risco (Parikh & Bhattacharyya, 2018; Roberts et al., 2020), especialmente entre adultos jovens (Sokolovsky et al., 2023).

Segundo Lin et al., 2016, a VEGF está associada a proliferação de células endoteliais, sobrevivência, invasão, migração, quimiotaxia de células progenitoras derivadas da medula óssea (BM), vasodilatação e permeabilidade vascular. Os autores destacam o envolvimento do eixo de sinalização de VEGF no câncer oral.

Sgambato et al., 2018, estudaram amostras de plasma de fumantes, e observaram níveis elevados de VEGF. Os níveis séricos de VEGF foram relacionados com a resposta tumoral, destacando esta citocina como um marcador prognóstico potencialmente útil no tratamento do câncer de cabeça e pescoço (Argiris et al., 2011), sendo destacado sua associação com a progressão e prognóstico dos carcinomas orais, sendo observados níveis mais elevados em tumores avançados (Chuang et al., 2006; Kyzas et al., 2005; Lisa Cheng et al., 2014; Patel et al., 2016).

Adicionalmente, os carcinógenos do tabaco aumentam a atividade de Fos/Jun Activator protein 1, levando ao aumento da expressão do VEGF, o que dá suporte a um fenótipo angiogênico que pode facilitar a progressão do câncer de cabeça e pescoço (Swenson et al., 2011).

A atividade reduzida de IL-10 pode levar a resposta inflamatória aumentada, já que esta é uma citocina anti-inflamatória que modula as respostas imunes (Laffer et al., 2019). Além disso, a deficiência de IL-10 está ligada à expressão gênica inflamatória aumentada devido à desregulação metabólica (York et al., 2024).

No presente estudo, os níveis salivares de IL-10 foram reduzidos na saliva de usuários de cigarros eletrônicos. Resultados em conformidade com Jacobs et al., 2022, e com RodríguezRabassa et al., 2018, que observaram que IL-10 foi modulado negativamente nos fumantes em comparação com amostras de não fumantes. Por outro lado, Aziz et al., 2015, analisaram as citocinas em saliva total não-estimulada em pacientes com carcinoma de células escamosas, observando níveis de IL-10 aumentados quando comparadas ao grupo controle.

Singh et al., 2017, concluíram que o polimorfismo da região promotora do gene IL-10 está significativamente associado à redução do risco de carcinoma de células escamosas oral, destacando que as citocinas desempenham um papel importante na fisiopatologia do câncer, podendo inibir o desenvolvimento e a progressão do tumor, se forem liberadas em resposta à inflamação.

Adicionalmente, Shields et al., 2020 notaram uma ligação significativa entre macrófagos carregados por lipídios e o aumento da citocina IL-10 em usuários de cigarros eletrônicos. Os autores afirmaram que por tal citocina ser supressora imunológica, atua no combate à inflamação, equilibrando a homeostase tecidual, podendo estar aumentada com o intuito de compensar desequilíbrios causados pela exposição aos agentes presentes nos cigarros eletrônicos.

Apesar da redução dos níveis de IL-10 em saliva de usuários de e-cig, houve correlação positiva entre níveis salivares mais elevados de IL-10 e a duração das sessões de uso do cigarro eletrônico. Esse achado pode ser atribuído à resposta anti-inflamatória induzida pela alta exposição diária ao vapor do cigarro eletrônico. Scieszka et al., 2023, destaca que a desregulação imunológica associada à exposição a irritantes presentes nos aerossóis do cigarro eletrônico, leva a alterações nos perfis de citocinas.

No presente estudo, os níveis salivares da proteína Klotho foram menores nos usuários de cigarros eletrônicos. O gene *Klotho* codifica uma proteína ligada à membrana reconhecida como um regulador essencial do estresse oxidativo e da senescência celular, especialmente do tecido pulmonar (Blake et al., 2015). A redução nos níveis de Klotho têm sido associados ao envelhecimento precoce e a diversas patologias crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e renais (Castelblanco et al., 2022; Donate-Correa, 2015; Fountoulakis et al., 2018).

O vapor do cigarro eletrônico ativa a NADPH oxidase, levando ao aumento da produção de radicais livres de oxigênio, enquanto compostos como aldeídos tóxicos contribuem para o estresse oxidativo e a morte celular (Kuntic et al., 2023). Assim, sugerimos que a redução nos níveis de Klotho identificada neste grupo pode refletir um processo de dano celular e

envelhecimento precoce, possivelmente decorrente do estresse oxidativo induzido pelo uso do e-cig.

Embora ainda não haja estudos específicos sobre o impacto do cigarro eletrônico nos níveis de Klotho, a literatura demonstra que exposição à fumaça do cigarro convencional induz estresse oxidativo e pode resultar em senescência celular nos pulmões ((Blake et al., 2015).

A redução de níveis séricos de α-Klotho podem estar associados à resposta compensatória ao estresse causado pelo tabagismo (Yao et al., 2022; Verde et al., 2017). Verde et al., 2017, sugeriram que o envelhecimento relacionado ao tabagismo poderia estar associado à redução de Klotho. Yao et al., 2022, relataram que níveis elevados de cotinina, um metabólito da nicotina, estão associados ao aumento da expressão de Klotho, enquanto níveis mais baixos se correlacionam com sua redução. E Kamizono et al., 2018 descaram que altos níveis de Klotho estão relacionados à resposta adaptativa ao estresse do tabagismo.

O presente estudo apresenta como limitações, além do tamanho amostral relativamente pequeno e seu desenho transversal, o que impede o estabelecimento de causalidade. Pesquisas futuras devem se concentrar em avaliar os efeitos de longo prazo do uso de cigarro eletrônico na saúde oral e geral.

CONCLUSÃO

O aumento da expressão dos mediadores inflamatórios IL-2, IL-6, TNF, VEGF e redução da IL-10 no grupo E-cig demonstram ambiente salivar com características próinflamatórias. Adicionalmente, a redução da expressão de proteína Klotho sugere um potencial envelhecimento prematuro das células. Ainda, observou-se correlação positiva entre período de consumo do cigarro eletrônico em anos e expressão de IL-6, entre uso simultâneo de cigarro eletrônico e álcool e expressão de TNF e entre tempo para cada sessão em minutos e expressão de IL-10. Essas alterações podem estar associadas a inflamação crônica, envelhecimento celular precoce e maior risco para doenças periodontais e malignas.

DECLARATIONS OF INTEREST: None

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants #2020/10362-0, #2020/10322-9, #2018/23248-1, and #2012/15165-2) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001for financial support.

REFERENCIAS

Argiris, A., Lee, S. C., Feinstein, T., Thomas, S., Branstetter IV, B. F., Seethala, R., Wang, L., Gooding, W., Grandis, J. R., & Ferris, R. L. (2011). Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncology*, *47*(10), 961–966. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.034

Aziz, S., Ahmed, S. S., Ali, A., Khan, F. A., Zulfiqar, G., Iqbal, J., Khan, A. A., & Shoaib, M. (2015). Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancer Investigation*, *33*(7), 318–328. https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1041642

Babiuch, K., Kuśnierz-Cabala, B., Kęsek, B., Okoń, K., Darczuk, D., & Chomyszyn-Gajewska, M. (2020). Evaluation of proinflammatory, nf-kappab dependent cytokines: Il-1α, Il-6, Il-8, and TNF-α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(3). https://doi.org/10.3390/jcm9030867

Barufaldi, L. A., Guerra, R. L., de Albuquerque, R. de C. R., Do Nascimento, A., Chança, R. D., de Souza, M. C., & de Almeida, L. M. (2021). Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. *Ciencia e Saude Coletiva*, *26*(12), 6089–6104. https://doi.org/10.1590/1413-812320212612.35032020

Behar, R. Z., Hua, M., & Talbot, P. (2015). Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. *PLoS ONE*, *10*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117222

Beklen, A., & Uckan, D. (2021). Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. *Human & Experimental Toxicology*, *40*(1), 25–34. https://doi.org/10.1177/0960327120943934

Bertoni, N., & Szklo, A. S. (2021). Electronic nicotine delivery systems in Brazilian state capitals: Prevalence, profile of use, and implications for the National Tobacco Control Policy. *Cadernos de Saude Publica*, *37*(7). https://doi.org/10.1590/0102-311X00261920

Binshabaib, M. S., Mehmood, A., Akram, Z., & ALHarthi, S. S. (2018). Peri-implant clinical and radiographic status and whole salivary cotinine levels among cigarette and waterpipe smokers and never-smokers. *Journal of Oral Science*, *60*(2), 247–252. https://doi.org/10.2334/josnusd.17-0221

Blake, D. J., Reese, C. M., Garcia, M., Dahlmann, E. A., & Dean, A. (2015). Soluble extracellular Klotho decreases sensitivity to cigarette smoke induced cell death in human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, *29*(7), 1647–1652. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.019

Boss, S., Bertolio, M., & Lipke, L. (2024). Inflammatory biomarker changes in healthy adults secondary to electronic cigarette use: A scoping review. *Immunity, Inflammation and Disease*, *12*(2). https://doi.org/10.1002/iid3.1170

Brailo, V., Vucicevic-Boras, V., Lukac, J., Biocina-Lukenda, D., Zilic-Alajbeg, I., Milenovic, A., & Balija, M. (2012). Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, *17*(1). https://doi.org/10.4317/medoral.17323

Buchanan, N. D., Grimmer, J. A., Tanwar, V., Schwieterman, N., Mohler, P. J., & Wold, L. E. (2020). Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. *Cardiovascular Research*, *116*(1), 40–50. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz256

Cao, D. J., Aldy, K., Hsu, S., McGetrick, M., Verbeck, G., De Silva, I., & Feng, S. yi. (2020). Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury. In *Journal of Medical Toxicology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 295–310). Springer. https://doi.org/10.1007/s13181-020-00772-w

Carvalho, B. F. do C., Faria, N. de C., Silva, K. C. S., Greenfield, E., Alves, M. G. O., Dias, M., Mendes, M. A., Pérez-Sayáns, M., & Almeida, J. D. (2024). Salivary Metabolic Pathway Alterations in Brazilian E-Cigarette Users. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(21), 11750. https://doi.org/10.3390/ijms252111750

Castelblanco, E., Hernández, M., Alonso, N., Ribes-Betriu, A., Real, J., Granado-Casas, M., Rossell, J., Rojo-López, M. I., Dusso, A. S., Julve, J., & Mauricio, D. (2022). Association of α-klotho with subclinical carotid atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, *21*(1), 207. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01640-3

Cavalcante, T. M., Szklo, A. S., Perez, C. de A., Thrasher, J. F., Szklo, M., Ouimet, J., Gravely, S., Fong, G. T., & Almeida, L. M. de. (2017). Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e

percepção de risco no Brasil: Resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. *Cadernos de Saude Publica*, *33*, 1–11. https://doi.org/10.1590/0102-311X00074416

Chuang, H. C., Su, C. Y., Huang, H. Y., Chien, C. Y., Chen, C. M., & Huang, C. C. (2006). High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*, *116*(7), 1175–1179. https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000224338.56902.28

Cichońska, D., Kusiak, A., Kochańska, B., Ochocińska, J., & Świetlik, D. (2019). Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(22). https://doi.org/10.3390/ijerph16224433

Da Silva, A. L. O., & Moreira, J. C. (2019). The ban of eletronic cigarettes in brazil: Success or failure? *Ciencia e Saude Coletiva*, *24*(8), 3013–3024. https://doi.org/10.1590/1413-81232018248.24282017

Deepthi, G., Nandan, S. R. K., & Kulkarni, P. G. (2019). Salivary tumour necrosis factor-α as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *20*(7), 2087–2093. https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2087

Dikova, V., Jantus-Lewintre, E., & Bagan, J. (2021). Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(8), 1658. https://doi.org/10.3390/jcm10081658

Donate-Correa, J. (2015). Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. *World Journal of Biological Chemistry*, *6*(4), 351. https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.351

Faridoun, A., Sultan, A. S., Jabra-Rizk, M. A., Weikel, D., Varlotta, S., & Meiller, T. F. (2021). Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: A cross-sectional study. *Oral Diseases*, *27*(2), 277–279. https://doi.org/10.1111/odi.13533

Ferrari, E., Pezzi, M. E., Cassi, D., Pertinhez, T. A., Spisni, A., & Meleti, M. (2021). Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 6795. https://doi.org/10.3390/ijms22136795

Fountoulakis, N., Maltese, G., Gnudi, L., & Karalliedde, J. (2018). Reduced Levels of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline in Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*(5), 2026–2032. https://doi.org/10.1210/jc.2018-00004 Ganapathy, V., Manyanga, J., Brame, L., McGuire, D., Sadhasivam, B., Floyd, E., Rubenstein, D. A., Ramachandran, I., Wagener, T., & Queimado, L. (2017). Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. *PLoS ONE*, *12*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177780

Ganesan, S. M., Dabdoub, S. M., Nagaraja, H. N., Scott, M. L., Pamulapati, S., Berman, M. L., Shields, P. G., Ellen Wewers, M., & Kumar, P. S. (2020). *Adverse effects of electronic cigarettes on the disease-naive oral microbiome*. http://advances.sciencemag.org/

Glasser, A., Abudayyeh, H., Cantrell, J., & Niaura, R. (2018). *Patterns of E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: Review of the Impact of E-Cigarettes on Cigarette Smoking*. https://doi.org/10.1093/ntr/nty103/4998820

Glogauer, J. E., Sun, C. X., Bradley, G., & Magalhaes, M. A. O. (2015). Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. *Cancer Immunology Research*, *3*(11), 1218–1226. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0017

Goertzen, C., Mahdi, H., Laliberte, C., Meirson, T., Eymael, D., Gil-Henn, H., & Magalhaes, M. (2018). Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 49). www.oncotarget.com

González-Reimers, E. (2014). Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(40), 14660. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14660

Greenfield, E., Alves, M. de S., Rodrigues, F., Nogueira, J. O., da Silva, L. F., de Jesus, H. P., Cavalcanti, D. R., Carvalho, B. F. do C., Almeida, J. D., Mendes, M. A., & Oliveira Alves, M. G. (2023). Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. *ACS Omega*, *8*(40), 36845–36855. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03683

Ho, M. Y., Tang, S. J., Chuang, M. J., Cha, T. L., Li, J. Y., Sun, G. H., & Sun, K. H. (2012). TNFα induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3βdependent mechanism. *Molecular Cancer Research*, *10*(8), 1109–1119. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0160

Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. In *International Journal of Cancer* (Vol. 121, Issue 11, pp. 2373–2380). https://doi.org/10.1002/ijc.23173

Instituto Nacional do Câncer - INCA. (2019, November 13). *Cigarros Eletronicos - O que Sabemos?* Https://Www.Inca.Gov.Br/Bvscontrolecancer/Publicacoes/Edicao/Cigarros_eletronicos.Pdf.

Invernizzi, G. (2011). *Persistence of systemic inflammation in COPD in spite of smoking cessation La persistenza dell'infiammazione nella BPCO nonostante la cessazione dal fumo*.

Jacobs, M., Verschraegen, S., Salhi, B., Anckaert, J., Mestdagh, P., Brusselle, G. G., & Bracke, K. R. (2022). IL-10 producing regulatory B cells are decreased in blood from smokers and COPD patients. *Respiratory Research*, *23*(1), 287. https://doi.org/10.1186/s12931-022-02208-1

Ji, E. H., Elzakra, N., Chen, W., Cui, L., Lee, E. S., Sun, B., Messadi, D., Xia, T., Zhu, Y., & Hu, S. (2019). E-cigarette aerosols induce unfolded protein response in normal human oral keratinocytes. *Journal of Cancer*, *10*(27), 6915–6924. https://doi.org/10.7150/jca.31319

Jia, S., Zhang, R., Li, Z., & Li, J. (2017). *Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer*. www.impactjournals.com/oncotarget

Jităreanu, A., Agoroaei, L., Aungurencei, O. D., Goriuc, A., Diaconu Popa, D., Savin, C., Caba, I.C., Tătărușanu, S., Profire, B., & Mârțu, I. (2021). Electronic Cigarettes' Toxicity: From Periodontal Disease to Oral Cancer. *Applied Sciences*, *11*(20), 9742. https://doi.org/10.3390/app11209742

Juretić, M., Cerović, R., Belušić-Gobić, M., Brekalo Pršo, I., Kqiku, L., Špalj, S., Pezelj-Ribarić, S., & Pezelj-Ribarić, S. (2013). Short Communication Salivary Levels of TNF-α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions). In *Folia Biologica (Praha)* (Vol. 59).

Kaluarachchi, M. R., Boulangé, C. L., Garcia-Perez, I., Lindon, J. C., & Minet, E. F. (2016). Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. *Bioanalysis*, *8*(19), 2023–2043. https://doi.org/10.4155/bio-2016-0108

Kamizono, Y., Shiga, Y., Suematsu, Y., Imaizumi, S., Tsukahara, H., Noda, K., Kuwano, T., Fujimi, K., Saku, K., & Miura, S. I. (2018). Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. *Medicine (United States)*, *97*(35). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011947

Katarina Gustafsson. (2013, September 13). *Imperial Tobacco concorda em adquirir a unidade de cigarros eletrônicos da Dragonite*. Https://Www.Bloomberg.Com/News/Articles/2013-0902/Imperial-Tobacco-Agrees-to-Acquire-Dragonite-s-e-Cigarette-Unit.

Kosmider, L., Sobczak, A., Fik, M., Knysak, J., Zaciera, M., Kurek, J., & Goniewicz, M. L. (2014). Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine and Tobacco Research*, *16*(10), 1319–1326. https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078

Kuntic, I., Kuntic, M., Oelze, M., Stamm, P., Karpi, A., Kleinert, H., Hahad, O., Münzel, T., & Daiber, A. (2023). The role of acrolein for E-cigarette vapour condensate mediated activation of NADPH oxidase in cultured endothelial cells and macrophages. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *475*(7), 807–821. https://doi.org/10.1007/s00424-023-02825-9

Kyzas, P. A., Geleff, S., Batistatou, A., Agnantis, N. J., & Stefanou, D. (2005). Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*, *206*(2), 170–177. https://doi.org/10.1002/path.1776

Laffer, B., Bauer, D., Wasmuth, S., Busch, M., Jalilvand, T. V., Thanos, S., Meyer zu Hörste, G., Loser, K., Langmann, T., Heiligenhaus, A., & Kasper, M. (2019). Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00430

Lee, P. N., Coombs, K. J., & Afolalu, E. F. (2019). Considerations related to vaping as a possible gateway into cigarette smoking: an analytical review. *F1000Research*, *7*, 1915. https://doi.org/10.12688/f1000research.16928.3

Lee, S. H., & Choi, Y. H. (2013). Link between Periodontal Disease and Cancer: A Recent Research Trend. *Journal of Life Science*, *23*(4), 602–608. https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.4.602

Lin, X., Khalid, S., Qureshi, M. Z., Attar, R., Yaylim, I., Ucak, I., Yaqub, A., Fayyaz, S., Farooqi, A. A., & Ismail, M. (2016). VEGF mediated signaling in oral cancer. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, *62*(14), 64–68.

Lisa Cheng, Y., Jordan, L., Gorugantula, L. M., Schneiderman, E., Chen, H., & Rees, T. (2014). Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. *Journal of Periodontology*, *85*(7), 956–965. https://doi.org/10.1902/jop.2013.130320

Ma, C., Xi, B., Li, Z., Wu, H., Zhao, M., Liang, Y., & Bovet, P. (2021). Prevalence and trends in tobacco use among adolescents aged 13–15 years in 143 countries, 1999–2018: findings from the Global Youth Tobacco Surveys. *The Lancet Child and Adolescent Health*, *5*(4), 245–255. https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30390-4

Malta, D. C., Hallal, A. L. C., Machado, Í. E., Do Prado, R. R., De Oliveira, P. P. V., Campos, M. O., & De Souza, M. D. F. M. (2018). Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *21*. https://doi.org/10.1590/1980-549720180006.supl.1

Mihaila, R. G., & Todor, S. B. (2024). *Bridging Periodontal Disease and Myeloproliferative Neoplasms: The Role of Immune Dysregulation and Inflammatory Mediators*. https://doi.org/10.20944/preprints202411.0876.v1

Miluna, S., Melderis, R., Briuka, L., Skadins, I., Broks, R., Kroica, J., & Rostoka, D. (2022). The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. *Dentistry Journal*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/dj10080154

Modeling, L. M., Measurement, F., Snowrift, O. N., Environmental, A. R., Regional, S., Power, E., Limited, G. C., Influence, T. H. E., Snow, O. F., On, F., Around, S., Embankment, T. H. E., Wind, I. N., Snow, B., Aspect, O. F., On, R. R., Distribution, S., Model, A. A. C., Simulation, N., … Maciejowski, J. M. (2019). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, *26*(3), 1–4. https://doi.org/10.1007/s11273-020-09706-3%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jweia.2017.09.008%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117919%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.coldregions.2020.103116%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jweia.2010.12.004%0Ahttp://dx.doi.o

Mokeem, S. A., Alasqah, M. N., Michelogiannakis, D., Al-Kheraif, A. A., Romanos, G. E., & Javed, F. (2018). Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *61*, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.016

Navale, A. M., Deshpande, A., Mistry, B., Chauhan, P., & Bhagat, C. (2023). Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, *24*(1), 114–126. https://doi.org/10.2174/1568009623666230511113916

Navazesh, M., & Kumar, S. K. S. (2008). Measuring salivary flow. *The Journal of the American Dental Association*, *139*, 35S-40S. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0353

Ng, M., Freeman, M. K., Fleming, T. D., Robinson, M., Dwyer-Lindgren, L., Thomson, B., Wollum, A., Sanman, E., Wulf, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L., & Gakidou, E. (2014). Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA*, *311*(2), 183–192. https://doi.org/10.1001/jama.2013.284692

Oliveira Alves, M. G., da Silva Miguel, N., Ferreira, C. C. P., Alvarenga, E. R., Tonon, B. M., de Barros, P. P., Carta, C. F. L., Paschoal, M. B. N., de Sales Chagas, J. F., Bandeira, C. M., Nunes, F. D., & Almeida, J. D. (2020). Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *130*(3), 298–305. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2020.06.003

Oliveira-Campos, M., De Oliveira, M. M., Da Silva, S. U., Santos, M. A. S., Barufaldi, L. A., De Oliveira, P. P. V., Andrade, S. C. D. A., De Andreazzi, M. A. R., De Moura, L., Malta, D. C., & De Souza, M. D. F. M. (2018). Risk and protection factors for chronic noncommunicable diseases in adolescents in Brazilian capitals. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *21*. https://doi.org/10.1590/1980-549720180002.supl.1

PAHO/OPAS. (2023, December 14). *Medidas urgentes são necessárias para proteger as crianças e os jovens dos cigarros eletrônicos*.

Parikh, A. S., & Bhattacharyya, N. (2018). Patterns of concurrent cigarette, alcohol, and e-cigarette use: Off-setting or additive behaviors? *The Laryngoscope*, *128*(8), 1817–1821. https://doi.org/10.1002/lary.27133

Patel, J., Shah, F., Joshi, G., & Patel, P. (2016). Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *12*(2), 447. https://doi.org/10.4103/0973-1482.147765

Qasim, H., Karim, Z. A., Rivera, J. O., Khasawneh, F. T., & Alshbool, F. Z. (2017). Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System. *Journal of the American Heart Association*, *6*(9). https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006353

Rapado-González, Ó., Majem, B., Muinelo-Romay, L., López-López, R., & Suarez-Cunqueiro, M. M. (2016). Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 9). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms17091531

Roberts, W., Verplaetse, T., Peltier, M. K. R., Moore, K. E., Gueorguieva, R., & McKee, S. A. (2020). Prospective association of e-cigarette and cigarette use with alcohol use in two waves of the Population Assessment of Tobacco and Health. *Addiction*, *115*(8), 1571–1579. https://doi.org/10.1111/add.14980

Rodríguez-Rabassa, M., López, P., Rodríguez-Santiago, R. E., Cases, A., Felici, M., Sánchez, R., Yamamura, Y., & Rivera-Amill, V. (2018). Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11). https://doi.org/10.3390/ijerph15112479

Scieszka, D. P., Garland, D., Hunter, R., Herbert, G., Lucas, S., Jin, Y., Gu, H., Campen, M. J., & Cannon, J. L. (2023). Multi-omic assessment shows dysregulation of pulmonary and systemic immunity to e-cigarette exposure. *Respiratory Research*, *24*(1), 138. https://doi.org/10.1186/s12931-023-02441-2

Semlali, A., Chakir, J., Goulet, J. P., Chmielewski, W., & Rouabhia, M. (2011). Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *Journal of Periodontal Research*, *46*(5), 533–541. https://doi.org/10.1111/j.16000765.2011.01370.x

Serapinas, D., Narbekovas, A., Juskevicius, J., & Sakalauskas, R. (2010). *Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status Infiammazione sistemica nella BPCO in rapporto alla condizione tabagica*.

Sgambato, J. A., Jones, B. A., Caraway, J. W., & Prasad, G. L. (2018). Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. *Cytokine*, *107*, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.013

Shields, P. G., Song, M.-A., Freudenheim, J. L., Brasky, T. M., McElroy, J. P., Reisinger, S. A., Weng, D. Y., Ren, R., Eissenberg, T., Wewers, M. D., & Shilo, K. (2020). Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. *EBioMedicine*, *60*, 102982. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102982

Simsek Ozek, N., Zeller, I., Renaud, D. E., Gümüs, P., Nizam, N., Severcan, F., Buduneli, N., & Scott, D. A. (2016). Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. *Journal of Dental Research*, *95*(13), 1472–1478. https://doi.org/10.1177/0022034516663696

Singh, K. P., Lawyer, G., Muthumalage, T., Maremanda, K. P., Khan, N. A., McDonough, S. R., Ye, D., McIntosh, S., & Rahman, I. (2019). Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. *ERJ Open Research*, *5*(4), 00182–02019. https://doi.org/10.1183/23120541.00182-2019

Singh, P. K., Ahmad, M. K., Kumar, V., Gupta, R., Kohli, M., Jain, A., Mahdi, A. A., Bogra, J., & Chandra, G. (2017). Genetic polymorphism of interleukin-10 (-A592C) among oral cancer with squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*, *77*, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.12.011

Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 531–548). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14

Sokolovsky, A. W., Rubenstein, D., Gunn, R. L., White, H. R., & Jackson, K. M. (2023). Associations of daily alcohol, cannabis, combustible tobacco, and e-cigarette use with sameday co-use and poly-use of the other substances. *Drug and Alcohol Dependence*, *251*, 110922. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2023.110922

Soneji, S., Barrington-Trimis, J. L., Wills, T. A., Leventhal, A. M., Unger, J. B., Gibson, L. A., Yang, J. W., Primack, B. A., Andrews, J. A., Miech, R. A., Spindle, T. R., Dick, D. M., Eissenberg, T., Hornik, R. C., Dang, R., & Sargent, J. D. (2017). Association between initial use of e-cigarettes and subsequent cigarette smoking among adolescents and young adults a systematic review and meta-analysis. In *JAMA Pediatrics* (Vol. 171, Issue 8, pp. 788–797). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1488

State Fact Sheets. (2022). *Smoking & Tobacco Use* .

Https://Www.Cdc.Gov/Tobacco/Stateandcommunity/State-Fact-Sheets/Index.Htm.

Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K. I., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associatedwith staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1645–1655. https://doi.org/10.1128/JB.01672-12

Sun, Z., Meng, Y., Liu, G., Jiang, Y., Meng, Q., & Hu, S. (2016). Effect of interleukin-1β and tumor necrosis factor α gene silencing on mouse gastric cancer cell proliferation and migration. *Oncology Letters*, *11*(4), 2559–2565. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4253

Sundar, I. K., Javed, F., Romanos, G. E., & Rahman, I. (2016). E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. *Oncotarget*, *7*(47), 77196–77204. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12857

Swenson, W. G., Wuertz, B. R. K., & Ondrey, F. G. (2011). Tobacco carcinogen mediated upregulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, *50*(9), 668–679. https://doi.org/10.1002/mc.20775

Szadkowski, A., & Myers, C. R. (2008). Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells. *Toxicology*, *243*(1–2), 164–176. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.004

szklo2011. (n.d.).

Verde, Z., González-Moro, J. M. R., Chicharro, L. M., Reinoso-Barbero, L., Bandrés, F., GómezGallego, F., & Santiago, C. (2017). A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. *Lung*,
195(1), 53–57. https://doi.org/10.1007/s00408-016-9944-6

Wisniewski, B. T., Sharma, J., Legan, E. R., Paulson, E., Merrill, S. J., & Manogaran, A. L. (2018). Toxicity and infectivity: insights from de novo prion formation. *Current Genetics*, *64*(1), 117–123. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0736-1

Yao, Y., Long, Y., Du, F. W., Zhao, Y., & Luo, X. Bin. (2022). Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. *Tobacco Induced Diseases*, *20*(6). https://doi.org/10.18332/tid/144622

Ye, D., Gajendra, S., Lawyer Bs, G., Bds, J., Pishey Bds, D., Pathagunti Bds, S., Lyons Rdh, J., Veazie, P., Watson, G., Mcintosh Phd, S., & Rahman, I. (2020). *Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping*. https://doi.org/10.1902/jper.10528

York, A. G., Skadow, M. H., Oh, J., Qu, R., Zhou, Q. D., Hsieh, W.-Y., Mowel, W. K., Brewer, J. R., Kaffe, E., Williams, K. J., Kluger, Y., Smale, S. T., Crawford, J. M., Bensinger, S. J., & Flavell, R. A. (2024). IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. *Nature*, *627*(8004), 628–635. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07098-5

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. *et al*. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

ABBAS, Abul K. *et al.* Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospectsSci. Immunol. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://immunology.sciencemag.org/>.

ABRAHAM, Carmela R.; LI, Anne. **Aging-suppressor Klotho: Prospects in diagnostics and therapeutics**. **Ageing Research Reviews**Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2022.

ABRAMOVITZ, Lilach *et al.* KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4254–4266, 1 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-RDC n. 46/2009**.

AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745–756, set. 2003.

AGGARWAL, Bharat B.; GUPTA, Subash C.; KIM, Ji Hye. **Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey**. **Blood**American Society of Hematology, , 19 jan. 2012.

AGGARWAL, Divya; LIMDI, Jimmy K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 13–19, 11 jan. 2015.

ALMEIDA, D. '. *et al.* **Lesões Pulmonares Associadas ao Uso do Cigarro Eletrônico**. *[S.l.: S.n.]*.

AL-MOMANY, Nairooz H. *et al.* Analysis of Factors That Interrupt With INR Control in the First Anticoagulation Clinic Monitoring Jordanian Patients. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 25, 13 ago. 2019.

ALQAHTANI, Fawaz *et al.* Comparison of cotinine levels in the peri-implant sulcular fluid among cigarette and waterpipe smokers, electronic-cigarette users, and nonsmokers. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, n. 4, p. 702–707, 2019.

ALVES, Kaoane Taynã; SEVERI, Letícia Sarturi Pereira. Componentes salivares associados à prevenção da cárie dental revisão de literatura / Salivary components associated with prevention of dental caries literature review. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo** , 2016.

AMER, Hatem W.; WAGUIH, Hend M.; EL-ROUBY, Dalia H. Development of field cancerization in the clinically normal oral mucosa of shisha smokers. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 17, n. 1, p. 39–45, 2019.

APTE, Ron N.; VORONOV, Elena. Interleukin-1—a major pleiotropic cytokine in tumor–host interactions. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, n. 4, p. 277–290, ago. 2002.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011a.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011b.

ASADULLAH, K. *et al.* IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 783–794, 15 fev. 1998.

AZIMI-NEZHAD, Mohsen. **Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathologyReports of Biochemistry & Molecular Biology**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.RBMB.net>.

AZIZ, S. A.; SRAMKOSKI, R. M.; CALIGIURI, M. A. Elevated IL-10 production by oral cancer cells induced by tobacco-specific carcinogen: implications for immune evasion. **Tobacco and Cancer**, 2015.

AZIZ, Salman *et al.* Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 7, p. 318–328, 9 ago. 2015.

BABIUCH, Karolina *et al.* Evaluation of proinflammatory, nf-kappab dependent cytokines: Il-1α, Il-6, Il8, and TNF-α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2020.

BAGAN, Leticia *et al.* Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 4, p. 737–743, 1 maio 2016.

BALKWILL, Frances. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361– 371, 3 maio 2009.

BARRINGTON-TRIMIS, Jessica L.; LEVENTHAL, Adam M. Adolescents' Use of "Pod Mod" E-Cigarettes — Urgent Concerns. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 12, p. 1099–1102, 20 set. 2018.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021a.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021b.

BATISTA, Bianca G. *et al.* **USO INDISCRIMINADO DO CIGARRO ELETRÔNICO E SEUS MALEFÍCIOS AO TRATO RESPIRATÓRIO**. *[S.l.: S.n.]*.

BEHAR, Rachel Z.; HUA, My; TALBOT, Prue. Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 10 fev. 2015.

BEKLEN, A.; UCKAN, D. Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 25–34, 30 jan. 2021.

BERNARDES-SOUZA, Breno *et al.* Facial-aging mobile apps for smoking prevention in secondary schools in Brazil: Appearance-focused interventional study. **Journal of Medical Internet Research**, v. 20, n. 7, p. 1–18, 2018.

BERTONI, Neilane *et al.* Electronic cigarettes and narghile users in Brazil: Do they differ from cigarettes smokers? **Addictive Behaviors**, v. 98, 1 nov. 2019.

BERTONI, Neilane; SZKLO, André Salém. Electronic nicotine delivery systems in Brazilian state capitals: Prevalence, profile of use, and implications for the National Tobacco Control Policy. **Cadernos de Saude Publica**, v. 37, n. 7, 2021.

BINSHABAIB, Munerah S. *et al.* Peri-implant clinical and radiographic status and whole salivary cotinine levels among cigarette and waterpipe smokers and never-smokers. **Journal of Oral Science**, v. 60, n. 2, p. 247–252, 1 jun. 2018.

BITTMANN, Stefan. The Role of Klotho in Pediatric Premature Aging Diseases. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 19, n. 3, p. 345–354, 10 jul. 2023.

BLACHMAN-BRAUN, Ruben *et al.* **Hookah, is it really harmless? Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 2014.

BLAKE, David J. *et al.* Soluble extracellular Klotho decreases sensitivity to cigarette smoke induced cell death in human lung epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1647–1652, 1 out. 2015.

BOSTANCI, Nagihan *et al.* Salivary proteotypes of gingivitis tolerance and resilience. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 11, p. 1304–1316, 1 nov. 2020.

BOU FAKHREDDINE, Hisham M.; KANJ, Amjad N.; KANJ, Nadim A. **The growing epidemic of water pipe smoking: Health effects and future needs**. **Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 1 set. 2014.

BOYKAN, Rachel; GONIEWICZ, Maciej L.; MESSINA, Catherine R. Evidence of Nicotine Dependence in Adolescents Who Use Juul and Similar Pod Devices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 12, p. 2135, 17 jun. 2019.

BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 27 jan. 2008.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012a.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012b.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 17, n. 1, p. e10-5, 1 jan. 2012c.

BRANDAO-RANGEL, Maysa Alves Rodrigues *et al.* Pulmonary function changes in older adults with and without metabolic syndrome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

BRENTANI, Maria Mitzi; ANELLI, Tânia de Fátima Moredo. **Bases da Oncologia**. São Paulo: *[S.n.]*.

BRIGGS, K.; BELL, C.; BREIK, O. **What should every dental health professional know about electronic cigarettes? Australian Dental Journal**John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2021.

BUCHANAN, Nicholas D. *et al.* Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2020a.

BUCHANAN, Sarah *et al.* **Klotho, Aging, and the Failing Kidney**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 27 ago. 2020b.

CAO, Dazhe James *et al.* **Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury**. **Journal of Medical Toxicology**Springer, , 1 jul. 2020.

CARSWELL, E. A. *et al.* **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage) Zymosan (from Saccharomyces cerviiae) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W**. *[S.l.: S.n.]*.

CARVALHO, Bruna Fernandes do Carmo *et al.* Salivary Metabolic Pathway Alterations in Brazilian ECigarette Users. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11750, 1 nov. 2024.

CASTAGNOLA, M. *et al.* **Potential applications of human saliva as diagnostic fluid Le potenziali applicazioni della saliva umana come fluido diagnosticoACTA oTorhinolAryngologiCA iTAliCA**. *[S.l.: S.n.]*.

CASTELBLANCO, Esmeralda *et al.* Association of α-klotho with subclinical carotid atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 21, n. 1, p. 207, 11 out. 2022.

CAVALCANTE, Tânia Maria *et al.* Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e percepção de risco no Brasil: Resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. **Cadernos de Saude Publica**, v. 33, p. 1–11, 2017.

CHALON, Stephan *et al.* Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 67, n. 4, p. 391–397, 2000.

CHAND, Hitendra S. *et al.* Pulmonary toxicity and the pathophysiology of electronic cigarette, or vaping product, use associated lung injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2020.

CHATHAM-STEPHENS, Kevin *et al.* **Morbidity and Mortality Weekly Report Characteristics of Hospitalized and Nonhospitalized Patients in a Nationwide Outbreak of E-cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury-United States, November 2019**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/assets/2019-Lung->.

CHAVES VIEIRA, Ângela; DA SILVA TEIXEIRA AGUIAR, Zildeny; SOUZA, Francielle Vieira. **TABAGISMO E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER BUCAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA SMOKING AND ITS RELATIONSHIP WITH ORAL CANCER: A LITERATURE REVIEW**. *[S.l.: S.n.]*.

CHEN, Chih-Jung *et al.* High expression of interleukin 10 might predict poor prognosis in early stage oral squamous cell carcinoma patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, p. 25–30, jan. 2013.

CHEN, Z.; MALHOTRA, P. S.; THOMASETAL, G. R. Expressionofpro inflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer,. *In*: **Clinical Cancer Research**. *[S.l.: S.n.]*. v. 5 p. 1369–1379.

CHENG, Shih Jung *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 50–57, 2011.

CHIAPPIN, Silvia *et al.* **Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation**. **Clinica Chimica Acta**, ago. 2007.

CHUANG, Hui Ching *et al.* High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. **Laryngoscope**, v. 116, n. 7, p. 1175–1179, jul. 2006.

CICHOŃSKA, Dominika *et al.* Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 22, 12 nov. 2019.

CLARK, Cheryl A. *et al.* Curcumin inhibits carcinogen and nicotine-induced mammalian target of rapamycin pathway activation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 12, p. 1586–1595, dez. 2010.

DA SILVA, André Luiz Oliveira; MOREIRA, Josino Costa. The ban of eletronic cigarettes in brazil: Success or failure? **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 3013–3024, 1 ago. 2019.

DA SILVA LOPES III, Adair; CORDEIRO BARBOSA FILHO, Valter. **Valter Cordeiro Barbosa Filho I Wagner de Campos II Prevalence of alcohol and tobacco use among Brazilian adolescents: a systematic review Prevalência de consumo de álcool e tabaco entre adolescentes brasileiros: revisão sistemáticaRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

DA SILVA MACHADO BARRADAS, Ariel *et al.* **Os riscos do uso do cigarro eletrônico entre os jovens The risks of using electronic cigarettes among young people Los riesgos de consumir cigarrillos electrónicos entre los jóvenesGlob Clin Res**. *[S.l.: S.n.]*.

DA SILVA, Sandra Tavares *et al.* **Combate ao tabagismo no Brasil: A importância estratégica das ações governamentais**. **Ciencia e Saude Coletiva**, fev. 2014.

DAWES, B. Y. C.; WES, C. D. A. Biology, of 1974). p. 535–548, 1975.

DE ARAUJO, Alberto José. **Perguntas & Respostas: Narguilé ou Cachimbo de água SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**. *[S.l.: S.n.]*.

DE LIMA. delima2003. 2003.

DEEPTHI, G.; NANDAN, S. R. K.; KULKARNI, Pavan G. Salivary tumour necrosis factor-α as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 7, p. 2087–2093, 2019.

DIKOVA, Valentina; JANTUS-LEWINTRE, Eloisa; BAGAN, Jose. Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1658, 13 abr. 2021.

DITTRICH SANTOS, Fabiane *et al.* **São Paulo-BrasilArq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol**. *[S.l.: S.n.]*.

DONATE-CORREA, Javier. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 351, 2015.

DONGIOVANNI, Paola *et al.* **Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation**. **International Journal of Oral Science**Springer Nature, , 1 dez. 2023.

DUARTE, Nathalia Camargo. **Perfil dos pacientes com câncer de boca do Núcleo de Cirurgia de Cabeça e Pescoço HU/UFSC e encaminhados para suporte odontológico no Núcleo de Odontologia Hospitalar HU/UFSC"**. *[S.l.: S.n.]*.

DUFFY, Sonia A. *et al.* Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 750–757, 15 ago. 2008.

EKER, Ebru Derici *et al.* Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 4490–4494, 21 nov. 2016.

EKER, Ebru Derici; KOYUNCU, Hayri; DILER, Songul Budak. Determination of Genotoxic Effects of Hookah Smoking by Micronucleus and Chromosome Aberration Methods. p. 4490–4494, 2016.

ELASHOFF, David *et al.* Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 4, p. 664–672, abr. 2012.

EL-HAJJ, Maya *et al.* Cigarette and waterpipe smoking are associated with the risk of stroke in Lebanon. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 1, p. 62–70, 2019.

ELISIA, Ingrid *et al.* The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

EPSTEIN SHOCHET, Gali *et al.* Fibroblast paracrine TNF-α signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, 19 jun. 2017.

ESTEBAN-LOPEZ, Maria *et al.* Health effects and known pathology associated with the use of Ecigarettes. **Toxicol Rep.**, p. 1357–1368, 2022.

ETTER, Jean François. Levels of saliva cotinine in electronic cigarette users. **Addiction**, v. 109, n. 5, p. 825–829, 2014.

FARIDOUN, Afnan *et al.* Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: A cross-sectional study. **Oral Diseases**, v. 27, n. 2, p. 277–279, 1 mar. 2021.

FERRARI, Elena *et al.* Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6795, 24 jun. 2021.

FILIPPIDIS, Filippos T. *et al.* Two-year trends and predictors of e-cigarette use in 27 European Union member states. **Tobacco Control**, v. 26, n. 1, p. 98–104, 1 jan. 2017.

FOUNTOULAKIS, Nikolaos *et al.* Reduced Levels of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline in Type 2 Diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 5, p. 2026–2032, 1 maio 2018.

FUKAWA, Yuki *et al.* IL-1 Generated by Oral Squamous Cell Carcinoma Stimulates Tumor-Induced and RANKL-Induced Osteoclastogenesis: A Possible Mechanism of Bone Resorption Induced by the Infiltration of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 1 jan. 2023.

FULLER, Colin *et al.* Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: Systematic review with meta-analysis. **Head and Neck**, v. 37, n. 5, p. 755–762, 1 maio 2015.

GANAPATHY, Vengatesh *et al.* Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

GANESAN, Sukirth M. *et al.* **Adverse effects of electronic cigarettes on the disease-naive oral microbiome**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://advances.sciencemag.org/>.

GLASSER, Allison *et al.* Patterns of E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: Review of the Impact of E-Cigarettes on Cigarette Smoking. 2018.

GLOGAUER, Judah E. *et al.* Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 11, p. 1218–1226, 1 nov. 2015.

GOERTZEN, Cameron *et al.* **Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasionOncotarget**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.oncotarget.com>.

GOLDONI, Riccardo *et al.* **Malignancies and biosensors: A focus on oral cancer detection through salivary biomarkers**. **Biosensors**MDPI, , 1 out. 2021.

GOMES, Luciana Carneiro *et al.* REVISÃO DE LITERATURA: CÂNCER DE BOCA DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS LITERATURE REVIEW: DIAGNOSTIC MOUTH CANCER AND ASSOCIATED RISK FACTORS. **Revista Interdisciplinar em Saúde, Cajazeiras**, v. 5, n. 4, p. 655–670, 2018.

GORCZYNSKI, R.; STANLEU, J. **Imunologia Clínica**. Rio de Janeiro: Reichmann, 2001.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Critical review in oral biology & medicine: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 143–153, fev. 2011.

GREBENCIUCOVA, Elena; VANHAERENTS, Stephen. **Interleukin 6: at the interface of human health and disease**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media SA, , 2023.

GREENFIELD, Ellen *et al.* Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. **ACS Omega**, v. 8, n. 40, p. 36845–36855, 10 out. 2023.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

GUO, Jiehong; HECHT, Stephen S. DNA damage in human oral cells induced by use of e-cigarettes. **Drug Test Anal**, p. 1189–1197, 2023.

HAMMAL, Fadi *et al.* "Herbal" but potentially hazardous: an analysis of the constituents and smoke emissions of tobacco-free waterpipe products and the air quality in the cafés where they are served. *[S.d.]*.

HAMMOND, David *et al.* USE OF JUUL E-CIGARETTES AMONG YOUTH IN THE UNITED STATES. 2018.

HASTURK, Hatice; KANTARCI, Alpdogan; VAN DYKE, Thomas E. Paradigm shift in the pharmacological management of periodontal diseases. *In*: **Periodontal Disease**. *[S.l.]*: S. Karger AG, 2011. v. 15 p. 160–176.

HELEN, Gideon St *et al.* Nicotine and carcinogen exposure after water pipe smoking in hookah bars. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 2014.

HESS, Catherine Ann *et al.* E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. **Environmental Research**, v. 152, p. 221–225, 1 jan. 2017.

HILTON, Robert *et al.* **E-cigarettes and Vaping Associated Lung Injury: A Case Series and Brief Review**. **American Journal of the Medical Sciences**Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

HO, Ming Yi *et al.* TNF-α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3β-dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 1109–1119, ago. 2012.

HODGE, D. R.; PENG, B.; CHERRY, J. C. "Interleukin6supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter meth ylation. **Cancer Research**, v. 65, p. 4673–4682, 2005.

HOYER, Katrina K. et al. **Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease**. *[S.l.: S.n.]*.

HUSSAIN, S. Perwez; HARRIS, Curtis C. **Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials**. **International Journal of Cancer**, 1 dez. 2007.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: smokeless tobacco and some tobacco-specific nitrosamines.** Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol89/mono89.pdf.>.

INCA. Causas e prevenção. **Instituto Nacional de Câncer**, p. 1–6, 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tabagismo: Dados Numéricos**. . Acesso em: 31 mar. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Centro colaborador da OPAS/OMS sobre o controle do tabaco**. . Acesso em: 4 abr. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **legisladores Uso de narguilé : efeitos sobre a saúde , necessidades de pesquisa**. *[S.l.: S.n.]*.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). **Programa Nacional de Controle do Tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Prevalência do tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Convenção-Quadro sobre Controle do Uso do Tabaco (CQCT)**.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Cigarros Eletronicos - O que Sabemos?**

INVERNIZZI, Giovanni. **Persistence of systemic inflammation in COPD in spite of smoking cessation La persistenza dell'infiammazione nella BPCO nonostante la cessazione dal fumo**. *[S.l.: S.n.]*.

JACOBS, Merel *et al.* IL-10 producing regulatory B cells are decreased in blood from smokers and COPD patients. **Respiratory Research**, v. 23, n. 1, p. 287, 17 out. 2022.

JANEWAY, Charles A. *et al.* O sistema imunológico na saúde e na doença. *In*: **Imunobiologia**. *[S.l.: S.n.]*.

JENSEN, R. P. Integration of Acid–Base and Electrolyte Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 389–392, 22 jan. 2015.

JI, Eoon Hye *et al.* E-cigarette aerosols induce unfolded protein response in normal human oral keratinocytes. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 27, p. 6915–6924, 2019.

JIA, Shiyu *et al.* **Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>.

JITĂREANU, Alexandra *et al.* Electronic Cigarettes' Toxicity: From Periodontal Disease to Oral Cancer. **Applied Sciences**, v. 11, n. 20, p. 9742, 19 out. 2021.

JURETIĆ, M. *et al.* **Short Communication Salivary Levels of TNF-α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions)Folia Biologica (Praha)**. *[S.l.: S.n.]*.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023–2043, 1 out. 2016a.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023–2043, 1 out. 2016b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018a.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018c.

KANEKO, Naoe *et al.* The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration**, v. 39, n. 1, p. 12, 6 dez. 2019.

KASSEM, Nada O. F. *et al.* Urinary NNAL in hookah smokers and non-smokers after attending a hookah social event in a hookah lounge or a private home. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 74–82, 1 out. 2017.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATARINA GUSTAFSSON. **Imperial Tobacco concorda em adquirir a unidade de cigarros eletrônicos da Dragonite**.

KHABOUR, Omar F. *et al.* Plasma and saliva levels of three metals in waterpipe smokers: a case control study. **Inhalation Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 224–228, 2018.

KHEMISS, Mehdi; KHELIFA, Mohamed Ben; SAAD, Helmi Ben. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow rate and consistency in relation to waterpipe tobacco smoking. **Libyan Journal of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 4–11, 2017.

KIM, J. J. *et al.* TNF-α-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420–1434, 5 set. 2010.

KIM, Jae Ho; JENROW, Kenneth A.; BROWN, Stephen L. **Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials**. **Radiation Oncology Journal**Department of Radiation Oncology, , 1 set. 2014.

KINANE. kinane2005. 2005.

KLUMB, Claudete E.; CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo B. **Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóidesRev.bras.hematol.hemoter**. *[S.l.: S.n.]*.

KONG, Lingyi; BIRKELAND, Andrew C. cancers Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: Current State and Future Challenges. 2021.

KORTE, Dina L.; KINNEY, Janet. Personalized medicine: An update of salivary biomarkers for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 26–37, 2016.

KOSMIDER, Leon *et al.* Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine solvent and battery output voltage. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 16, n. 10, p. 1319–1326, 1 out. 2014.

KRICK, Stefanie *et al.* Fibroblast growth factor 23 and Klotho contribute to airway inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 1, 1 jul. 2018.

KRISHNAN, Rajkumar *et al.* Association of Serum and Salivary Tumor Necrosis Factor-α with Histological Grading in Oral Cancer and its Role in Differentiating Premalignant and Malignant Oral Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7141–7148, 15 set. 2014.

KUMAR, Prabhat; GUPTA, Shilpi; DAS, Bhudev C. Saliva as a potential non-invasive liquid biopsy for early and easy diagnosis/prognosis of head and neck cancer. **Translational Oncology**, v. 40, 1 fev. 2024.

KUMARI, Swati *et al.* **A Review on Saliva-Based Health Diagnostics: Biomarker Selection and Future Directions**. **Biomedical Materials and Devices**Springer Nature, , 1 mar. 2024.

KUNTIC, Ivana *et al.* The role of acrolein for E-cigarette vapour condensate mediated activation of NADPH oxidase in cultured endothelial cells and macrophages. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 475, n. 7, p. 807–821, 7 jul. 2023.

KUO, Wu-Hsien *et al.* Effects of interleukin-10 polymorphisms and smoking on the risk of gastric cancer in Taiwan. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 5, p. 967–71, 2014.

KURO, Makoto. **Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing**. **Clinical Science**Portland Press Ltd, , 1 ago. 2021.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019a.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019b.

KUROSU, Hiroshi *et al.* Physiology: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 16 set. 2005.

KYZAS, Panayiotis A. *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 2, p. 170–177, jun. 2005.

LAFFER, Björn *et al.* Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 9 out. 2019.

LE CAMPION, Anna Carolina Omena Vasconcellos *et al.* Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 178–184, 2016.

LEE, Chia-Huei *et al.* Interleukin-1 beta transactivates epidermal growth factor receptor via the CXCL1-CXCR2 axis in oral cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38866–38880, 17 nov. 2015.

LEE, J. M. *et al.* **Salivary diagnostics**. *[S.l.: S.n.]*.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. **Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms**. **Journal of Dental Research**, fev. 2012.

LEE, L. T. *et al.* Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 6, p. 699–707, 1 jun. 2018.

LEE, Peter N.; COOMBS, Katharine J.; AFOLALU, Esther F. Considerations related to vaping as a possible gateway into cigarette smoking: an analytical review. **F1000Research**, v. 7, p. 1915, 22 jul. 2019.
LEE, Shin Hwa; CHOI, Yung Hyun. Link between Periodontal Disease and Cancer: A Recent Research Trend. **Journal of Life Science**, v. 23, n. 4, p. 602–608, 30 abr. 2013.

LEE, Yu-Hsiang *et al.* **Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases**. *[S.l.: S.n.]*.

LI, Lingling *et al.* Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extractinduced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27890–27900, 13 nov. 2015.

LIMA, Celina Faig *et al.* Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 441–446, 2010.

LIN, X. *et al.* VEGF mediated signaling in oral cancer. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 62, n. 14, p. 64–68, 30 dez. 2016.

LISA CHENG, Yi-Shing *et al.* Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 956–965, jul. 2014.

LISKMANN, Stanislav *et al.* Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 21, n. 4, p. 543–550, jul. 2006.

LIU, Yanqiu; OLSEN, Bjorn R. Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 363–368, 4 out. 2014.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–95, ago. 2011.

LOPEZ-LABADY, Jeaneth; BOLOGNA-MOLINA, Ronell; VILLARROEL-DORREGO, Mariana. Expression of Interleukin-1ß and Interleukin-8 in Oral Potentially Malignant Disorders and Carcinomas. **Frontiers in Oral Health**, v. 2, 10 set. 2021.

MA, Chuanwei *et al.* Prevalence and trends in tobacco use among adolescents aged 13–15 years in 143 countries, 1999–2018: findings from the Global Youth Tobacco Surveys. **The Lancet Child and Adolescent Health**, v. 5, n. 4, p. 245–255, 1 abr. 2021.

MALAMUD, Daniel. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–178, 2011.

MALEK, Thomas R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 6, p. 961–965, 1 dez. 2003.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Mudanças no uso do tabaco entre adolescentes brasileiros e fatores associados: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 29, n. 9, 2024.

MARTINON, Fabio; TSCHOPP, Jürg. Inflammatory Caspases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561–574, maio 2004.
MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. **Tobacco Control**, v. 24, p. i3–i12, 2015.

MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. *[S.d.]*.

MENEZES, Ana M. B. *et al.* **Mental health problems and smoking among adolescents from Southern BrazilRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.scielo.br/rsp>.

MENEZES, Ana Maria Baptista *et al.* Frequência do uso de narguilé em adultos e sua distribuição conforme características sociodemográficas, moradia urbana ou rural e unidades federativas: Pesquisa nacional de saúde (PNS), 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 57–67, 2015.

MIHAILA, Romeo Gabriel; TODOR, Samuel Bogdan. **Bridging Periodontal Disease and Myeloproliferative Neoplasms: The Role of Immune Dysregulation and Inflammatory Mediators**. , 12 nov. 2024.

MILUNA, Sintija *et al.* The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. **Dentistry Journal**, v. 10, n. 8, 1 ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Stella Martins. . **Quero parar de usar o cigarro eletrônico, o que fazer?**

MIRBOLOUK, Mohammadhassan *et al.* Prevalence and distribution of e-cigarette use among U.S. adults: Behavioral risk factor surveillance system, 2016. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 7, p. 429–438, 2 out. 2018.

MIRKESHAVARZ, M. *et al.* Interleukin-6 secreted by oral cancer- associated fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 6, n. 10, p. 131–136, 2017.

MISHRA, Aseem *et al.* **Harmful effects of nicotine**. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 mar. 2015.

MODELING, Lagrangian Method *et al.* No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. **Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics**, v. 26, n. 3, p. 1–4, 2019.

MOKEEM, Sameer A. *et al.* Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 38–43, 1 jul. 2018.

MOORE, Kevin W. *et al.* Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, abr. 2001.

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. . *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br,>.

MORETTI-PIRES, Rodrigo Otávio; CORRADI-WEBSTER, Clarissa Mendonça. Adaptação e validação do Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) para população ribeirinha do interior da Amazônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 497–509, mar. 2011.

MOTAMAYEL, A. Saliva as a mirror of the body health. **Dentistry**, p. 1–6, 2009.

MUHAMMAD, Waqar *et al.* Article assessment of unstimulated whole salivary tumor necrosis factor alpha (Tnf-α) and cellular micronuclei levels in snuff (naswar) users and non-users for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, 2 jul. 2021.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NAGLER, R. M. Altered salivary profile in heavy smokers and its possible connection to oral cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 22, n. 4, p. 274–280, 2007.

NAIK, Pooja; CUCULLO, Luca. **Pathobiology of tobacco smoking and neurovascular disorders: Untied strings and alternative products**. **Fluids and Barriers of the CNS**BioMed Central Ltd., , 31 out. 2015.

NATTO, Suzan; BALJOON, Mostafa; BERGSTRÖM, Jan. Tobacco smoking and periodontal bone height in a Saudi Arabian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 9, p. 1000–1006, set. 2005.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023a.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023b.

NAVAZESH, Mahvash; KUMAR, Satish K. S. Measuring salivary flow. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 35S-40S, maio 2008.

NEYRA, Javier A.; HU, Ming Chang; MOE, Orson W. **Klotho in clinical nephrology: Diagnostic and therapeutic implications**. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**American Society of Nephrology, , 1 jan. 2021.

NG, Marie *et al.* Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. **JAMA**, v. 311, n. 2, p. 183–192, 8 jan. 2014.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Vaping Devices (Electronic Cigarettes) DrugFacts**.

O'CONNELL, Grant; GRAFF, Donald W.; D'RUIZ, Carl D. Reductions in biomarkers of exposure (BoE) to harmful or potentially harmful constituents (HPHCs) following partial or complete substitution of cigarettes with electronic cigarettes in adult smokers. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 6, p. 443–454, 23 jul. 2016.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OLIVEIRA ALVES, Mônica Ghislaine *et al.* Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. 298–305, 1 set. 2020.

OLIVEIRA, Max Moura de *et al.* Características da Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar - PeNSE. **Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 605–616, 1 jul. 2017.

OLIVEIRA-CAMPOS, Maryane *et al.* Risk and protection factors for chronic noncommunicable diseases in adolescents in Brazilian capitals. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

OPAS/OMS. **Tabaco**.

OSMAN, Tarig A.; COSTEA, Daniela E.; JOHANNESSEN, Anne C. **The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma: A review of the literature**. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, maio 2012.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Folha Informativa Tabaco**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5641:folhainformativa-tabaco&Itemid=1097>.

PAHO/OPAS. **Medidas urgentes são necessárias para proteger as crianças e os jovens dos cigarros eletrônicos**.

PALATA, Ondrej *et al.* **Radiotherapy in combination with cytokine treatment**. **Frontiers in Oncology**Frontiers Media S.A., , 2019.

PANATTO, D. *et al.* **Tobacco smoking among students in an urban area in Northern ItalyJ prev med hyg**. *[S.l.: S.n.]*.

PANNEER SELVAM, Niranzena; SADAKSHARAM, Jayachandran. Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 236–241, 1 set. 2015.

PATEL, JayendrakumarB *et al.* Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 447, 2016.

PATIL, Shankargouda *et al.* Proteomic Changes in Oral Keratinocytes Chronically Exposed to Shisha (Water Pipe). **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 23, n. 2, p. 86–97, 1 fev. 2019a.

PATIL, Shankargouda *et al.* **The relationship of "shisha" (water pipe) smoking to the risk of head and neck cancer**. **Journal of Oral Pathology and Medicine**Blackwell Publishing Ltd, , 1 abr. 2019b.

PATIL, Shankargouda *et al.* Multiomic analysis of oral keratinocytes chronically exposed to shisha. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 284–289, 1 abr. 2019c.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019. *[S.d.]*.

POTEMPA-JEZIOROWSKA, Magdalena *et al.* Saliva and its value as a diagnostic material. **Pediatria i Medycyna Rodzinna**, v. 18, n. 1, p. 34–39, 31 maio 2022.

PRASAD, Gareema; MCCULLOUGH, Michael. Chemokines and cytokines as salivary biomarkers for the early diagnosis of oral Cancer. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging. **Cells**, v. 13, n. 17, p. 1413, 24 ago. 2024a.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. **Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging**. **Cells**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2024b.

QASIM, Hanan *et al.* Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 9, 22 set. 2017.

QASIM, Hanan *et al.* **The effects of hookah/waterpipe smoking on general health and the cardiovascular system**. **Environmental Health and Preventive Medicine**BioMed Central Ltd., , 14 set. 2019.

RAJ, Sonali; AHUJA, Mehak. The versatility of klotho protein: insights into its multifaceted functions in health and disease. **World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research**, p. 12–17, 5 jun. 2024.

RAPADO-GONZÁLEZ, Óscar *et al.* **Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 12 set. 2016.

RATHNAYAKE, Nilminie *et al.* Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 7, 20 jan. 2017.

RODRÍGUEZ-RABASSA, Mary *et al.* Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, 7 nov. 2018.

ROITT, I. ;.; BROSTOFF, J. ;.; MALE, D. **Imunologia**. 6a Ed. ed. São Paulo: Manole, 2003.

ROSENBERG, Steven A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 15 jun. 2014.

RUBINSTEIN, Mark L. *et al.* **Adolescent Exposure to Toxic Volatile Organic Chemicals From ECigarettes**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/>.

SABI, Salsabeel H. *et al.* Changes at global and site-specific DNA methylation of MLH1 gene promoter induced by waterpipe smoking in blood lymphocytes and oral epithelial cells. **Inhalation Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 124–130, 2020.

SAHEBJAMEE, Mahnaz; ATARBASHI-MOGHADAM, Fazele. **Salivary concentration of TNFα, IL1α, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma Article in Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal ·**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v13i5/medoralv13i5p292.pdf>.

SAMPAIO, Andréia dos Santos Silva *et al.* Perfil do paciente jovem com câncer de boca: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e29511830934, 19 jun. 2022.

SANCILIO, Silvia *et al.* Cytotoxicity and apoptosis induction by e-cigarette fluids in human gingival fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 3, p. 477–483, 1 abr. 2016.

SANTOS, Ubiratan Paula. Cigarro eletrônico--repaginação e renovação da indústria do tabagismo. **J Bras Pneumol**, v. 44, n. 5, p. 345–346, 2018.

SARAIVA, Margarida; VIEIRA, Paulo; O'GARRA, Anne. Biology and therapeutic potential of interleukin10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.

SATO, J.; GOTO, J.; MURATA, T. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamouscellcarcinoma. **"OralSurg ery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 3, p. 330–336, 2010.

SCHAPHER, Mirco; WENDLER, Olaf; GRÖSCHL, Michael. **Salivary cytokines in cell proliferation and cancer**. **Clinica Chimica Acta**, 18 set. 2011.

SCHERR, Andreas *et al.* Airway reactivity to mannitol is similarly increased in chronic cigarette and water pipe smokers. **International Journal of COPD**, v. 13, p. 157–163, 2018.

SCHLAUCH, Robert C. *et al.* The moderating effect of family involvement on substance use risk factors in adolescents with severe emotional and behavioral challenges. **Addictive Behaviors**, v. 38, n. 7, p. 2333–2342, jul. 2013.

SEDGER, Lisa M.; MCDERMOTT, Michael F. **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future**. **Cytokine and Growth Factor Reviews**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2014.

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. **Anatomia & Fisiologia**. 6ª Edição ed. *[S.l.]*: Lusociência, 2003.

SEMLALI, A. *et al.* Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 5, p. 533–541, out. 2011.

SEPULVEDA INOSTROZA, EA *et al.* Evaluation of micronuclei, cytomorphometric and cytologic changes of the oral mucosa in hookah and cigarette smokers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 137, n. 6, p. 640–650, jun. 2024.

SERAPINAS, Danielius *et al.* **Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status Infiammazione sistemica nella BPCO in rapporto alla condizione tabagica**. *[S.l.: S.n.]*.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018a.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018b.

SHAO, Zhe *et al.* Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with the angiogenesis and clinical outcome. **Oral Oncology**, v. 44, n. 12, p. 1110–1117, dez. 2008.

SHARMA, Mohit *et al.* Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 15, n. 5, p. 705–714, out. 2011.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. **Cytokines in anaesthesia Characteristics of cytokines (modified from Molloy, Mannick and Rodrick 86 and Abbas, Lichtman and Pober 1)British Journal of Anaesthesia**. *[S.l.: S.n.]*.

SHETH, Chirag C. *et al.* Modulation of salivary cytokines in response to alcohol, tobacco and caffeine consumption: a pilot study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

SHIELDS, Peter G. *et al.* Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. **EBioMedicine**, v. 60, p. 102982, out. 2020.

SHIHADEH, Alan *et al.* Toxicant content, physical properties and biological activity of waterpipe tobacco smoke and its tobacco-free alternatives. **Tobacco Control**, v. 24, p. i22–i30, 1 mar. 2015.

SHIPLO, Samantha; CZOLI, Christine D.; HAMMOND, David. E-cigarette use in Canada: Prevalence and patterns of use in a regulated market. **BMJ Open**, v. 5, n. 8, 2015.

SIEGEL, Michael B.; TANWAR, Kerry L.; WOOD, Kathleen S. Electronic cigarettes as a smokingcessation tool: Results from an online survey. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 40, n. 4, p. 472–475, abr. 2011.

SILVA, T. A. *et al.* Increased expression of IL-10 in tumor-associated macrophages is related to advanced clinical stages of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, p. 903–909, 2015.

SIMSEK OZEK, N. *et al.* Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 13, p. 1472–1478, 1 dez. 2016.

SINGH, Prerana; VERMA, Jitendra K.; SINGH, Jayant Kumar. Validation of Salivary Markers, IL-1β, IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

SINGH, Prithvi Kumar *et al.* Genetic polymorphism of interleukin-10 (-A592C) among oral cancer with squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 18–22, maio 2017.

SIRAVEGNA, Giulia *et al.* **Integrating liquid biopsies into the management of cancer**. **Nature Reviews Clinical Oncology**Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

SMITH, K. A.; FAVATA, M. F.; OROSZLAN, F. Production and characterization of monoclonal antibodies to human interleukin 2: strategy and tactics. **J Immunol**, 1983.

SOARES, Tatiana de Abreu Braga. **Cigarro e outras formas de tabaco: investigação de conhecimento, atitudes e percepção de risco em estudantes de medicina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental)—*[S.l.]*: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

SONEJI, Samir *et al.* **Association between initial use of e-cigarettes and subsequent cigarette smoking among adolescents and young adults a systematic review and meta-analysis**. **JAMA Pediatrics**American Medical Association, , 1 ago. 2017.

SOUZA, Miriam; SZKLO, Andre; DE ALMEIDA, Liz Maria. Impact of the reduction of smoking prevalence on the trend of lung cancer mortality in Brazil. Tobacco Induced Diseases. **Brazilian National Cancer Institute, Epidemiology Division, Brazil**, v. 16, p. 591, 2018.

ST. HELEN, Gideon *et al.* Nicotine and Carcinogen Exposure after Water Pipe Smoking in Hookah Bars. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 1 jun. 2014.

STATE FACT SHEETS. **Smoking & Tobacco Use** .

STJOHN, M. A.; LI, Y.; ..ZHOU. Interleukin6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology**, v. 130, n. 8, p. 929–935, 2004.

STRZELAK, Agnieszka *et al.* **Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**MDPI AG, , 21 maio 2018.

SUGIMOTO, Shinya *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associatedwith staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 8, p. 1645–1655, abr. 2013.

SULTAN, Ahmed S.; JESSRI, Maryam; FARAH, Camile S. Electronic nicotine delivery systems: Oral health implications and oral cancer risk. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 50, n. 3, p. 316– 322, 1 mar. 2021.

SUN, Zhongwei *et al.* Effect of interleukin-1β and tumor necrosis factor α gene silencing on mouse gastric cancer cell proliferation and migration. **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2559–2565, 1 abr. 2016.

SUNDAR, Isaac K. *et al.* E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77196–77204, 22 nov. 2016.

SWENSON, Wade G.; WUERTZ, Beverly R. K.; ONDREY, Frank G. Tobacco carcinogen mediated upregulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 9, p. 668–679, set. 2011.

szklo2011. *[S.d.]*.

TAATI, Behzad; ARAZI, Hamid; SUZUKI, Katsuhiko. **Oxidative stress and inflammation induced by waterpipe tobacco smoking despite possible protective effects of exercise training: A review of the literature**. **Antioxidants**MDPI, , 1 set. 2020.

TABRIZI, Reza *et al.* Hookah Smoking: A Potentially Risk Factor for First-Ever Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 10, 1 out. 2020.

TANG, Anqi *et al.* **Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 2023.

TANG, X. *et al.* Expression of klotho and β-catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. **Diseases of the Esophagus**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 1 abr. 2016.

TANIGUCHI, T.; HIROSHI, M.; TAKASHI, F. Structure and expression of a cloned cDNA for uman inlerleukin-2. **nature**, 1983.

TAYLOR, John J.; PRESHAW, Philip M. **Gingival crevicular fluid and saliva**. *[S.l.: S.n.]*.

THOMSON, P. **Lesões pré-malignas da boca: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: *[S.n.]*.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. A brief outline of the immune system. **Methods in Molecular Biology**, v. 1184, p. 3–12, 2014.

TORREY, Christine M. *et al.* Waterpipe cafes in Baltimore, Maryland: Carbon monoxide, particulate matter, and nicotine exposure. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 405–410, 19 jul. 2015.

TSAI, C. C. *et al.* Interleukin-1 beta in oral submucous fibrosis, verrucous hyperplasia and squamous cell carcinoma tissues. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 15, n. 9, p. 513–9, set. 1999.

UCHIDA, Hitoshi; OVITT, Catherine E. Novel impacts of saliva with regard to oral health. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 127, n. 3, p. 383–391, mar. 2022.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. **Journal of Cytology**, v. 33, n. 3, p. 125–129, 1 jul. 2016.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. v. 33, n. 3, p. 125–129, 2021.

URRUTIA-PEREIRA, M. *et al.* Youth tobacco use in Latin America: What is the real extent of the problem? **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 4, p. 328–335, 2019.

VAN HORSSEN, Remco; TEN HAGEN, Timo L. M.; EGGERMONT, Alexander M. M. **TNF-α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility Learning ObjectivesThe Oncologist**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.TheOncologist.com>.

VARGAS, Luana Soares *et al.* Riscos do uso alternativo do cigarro eletrônico: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 30, p. e8135, 20 jul. 2021.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p. 53–57, 1 fev. 2017a.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p. 53–57, 1 fev. 2017b.

VEZINA, P.; MCGEHEE, D. S.; GREEN, W. N. **Exposure to nicotine and sensitization of nicotineinduced behaviors**. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 15 nov. 2007.

VIEIRA, Ângela Chaves; AGUIAR, Zildeny da Silva Teixeira; SOUZA, Francielli Vieira. Tabagismo e sua relação com o câncer bucal: uma revisão de literatura. **Revista Bionorte**, v. 4, n. 2, p. 9–18, 2015.

WANG, Qihui *et al.* Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 427, p. 79–85, 1 jan. 2014.

WANG, Y. F.; CHANG, S. Y.; TAI, S. K. "Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 recep tor expressions in oral squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 24, n. 9, p. 850–858, 2002.

WARD, Kenneth D. **The waterpipe: An emerging global epidemic in need of action**. **Tobacco Control**BMJ Publishing Group, , 1 mar. 2015.

WARREN, Graham; SINGH, Anurag. Nicotine and lung cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v. 12, 1 jan. 2013.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **United Nations high-level meeting on noncommunicable disease prevention and control.**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/ bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies**.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco. n. May 2020, p. 1–8, 2021.

WILKINSON, Emma. Earlier cancer diagnosis would reduce NHS costs. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 12, p. e529, 2014.

WILLERSHAUSEN, Ines *et al.* Influence of E-smoking liquids on human periodontal ligament fibroblasts. **Head and Face Medicine**, v. 10, n. 1, 15 set. 2014.

WISNIEWSKI, Brett T. *et al.* Toxicity and infectivity: insights from de novo prion formation. **Current Genetics**, v. 64, n. 1, p. 117–123, 30 fev. 2018.

WISNIEWSKI, David J.; MA, Tao; SCHNEIDER, Abraham. Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. **Experimental Cell Research**, v. 370, n. 2, p. 343–352, 15 set. 2018.

WOLF, I. *et al.* Klotho: A tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094–7105, 27 nov. 2008.

WOODS, K. V. *et al.* Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens . **Cancer Research**, v. 58, n. 14, p. 3132–3141, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. *[S.l.: S.n.]*.

XIE, Biao *et al.* **Klotho acts as a tumor suppressor in cancers**. **Pathology and Oncology Research**, out. 2013.

YAMAZAKI, Yuji *et al.* Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Agedependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, jul. 2010.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022a.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022b.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. 2020.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. *[S.d.]*.

YOON, Angela J. *et al.* Inflammatory biomarkers in saliva: Assessing the strength of association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 5, p. 434–440, maio 2012.

YORK, Autumn G. *et al.* IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. **Nature**, v. 627, n. 8004, p. 628–635, 21 mar. 2024.

ZHANG, Aihua; SUN, Hui; WANG, Xijun. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1718–1727, nov. 2012.

ZHOU, Juan *et al.* Serum β-klotho is a potential biomarker in the prediction of clinical outcomes among patients with NSCLC. **Journal of Thoracic Disease**, v. 13, n. 5, p. 3137–3150, 1 maio 2021a.

ZHOU, Yan *et al.* The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 24 ago. 2021b.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Versão em inglês do artigo 1 nas normas do periódico "JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE" (ISSN: 0904-2512).

Assessment of salivary inflammatory mediators and Klotho protein in hookah and conventional cigarette smokers

Fernanda Rodrigues dos Santos[1], Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel[2], Thayná Isabele Stopiello Costa[1], Xabier Marichalar-Mendía[3], Janete Dias Almeida[1], Mario Pérez-Sayáns[4], Rodolfo de Paula Vieira[5], Mônica Ghislaine Oliveira Alves[6]*

1 Technology Research Center (NPT), Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil. 2 School of Medicine, Anhembi Morumbi University, Sao Jose dos Campos, Brazil. 3 Nursery I. Faculty of Medicine and Nursing. University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, Leioa, 48940, Bizkaia, Spain. xabier.marichalar@ehu.eus.

4 Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit (Medoralres), Faculty of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Instituto de los Materiales de Santiago de Compostela (Imatus), Santiago, Spain; Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (Idis) (Oralres Group), Santiago De Compostela, Spain. 5 Evangelical University of Goias (Unievangelica), Anápolis – GO, Brazil.
6 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

*Correspondence may also be addressed to: Mônica Ghislaine Oliveira Alves
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.
777 Eng. Francisco José Longo Avenue. São José dos Campos, São Paulo, Brazil
Zip code: 12245-000
Phone number: + 55 1239479411/+ 55 12981278200
E-mail: monica.alves@unesp.br

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the salivary profile of inflammatory mediators and Klotho protein in hookah and conventional cigarette smokers. Methods: Whole saliva samples were collected from the following three groups: 1) cigarette group consisting of 26 individuals who regularly smoked conventional cigarettes only; 2) hookah group consisting of 33 individuals who regularly smoked hookah only; 3) control group consisting of 30 non-smokers. The levels of IL-2, IL-1β, IL-6, TNF-α, VEGF and Klotho protein were analyzed using R&D DuoSet ELISA kits. The Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test were used to calculate the significance of comparisons between groups and Spearman correlation analysis was performed to examine the association between cytokines and clinical data. ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were constructed to determine the area under the curve (AUC), the sensitivity and specificity of salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. A p-value <0.05 was considered significant. Results: Salivary levels of the inflammattory cytokine IL-2 ($p<0.0001$), IL-6 ($p<0.0001$), IL-1β ($p<0.0001$), and TNF-α ($p<0.0001$) were higher among hookah and cigarette smokers compared to control. The levels of VEGF ($p<0.0001$) and Klotho protein ($p<0.0001$) were found to be reduced in the saliva of smokers. Regarding the correlation between salivary levels and clinical data, there was only a statistically significant negative correlation between age and IL-1β expression in the hookah group (Spearman correlation coefficient=-0.465, p=0.001) and between age and Klotho protein in the cigarette group (Spearman correlation coefficient=-0.455, p=0.038). ROC analysis for distinguishing the Hookah group from the Control group revealed an area under the curve of 0.975, 0.792, 0.898 and 1 for IL-2, IL-6, IL1-β and TNF-α, respectively. And ROC analysis for distinguishing the control group from the hookah group revealed an area under the curve of 0.998 and 0.886 for VEGF and Klotho, respectively. Conclusion: The results led us to conclude that the salivary environment of hookah and conventional cigarette smokers is characterized by high levels of proinflammatory mediators. Furthermore, the lower expression of Klotho protein in the saliva of smokers suggests potential premature aging of cells.

Keywords: Saliva. Salivary Immunity. ELISA. Cytokines. Hookah. Smoking

INTRODUCTION

Smoking is recognized as a public health issue, which accounts for 8 million deaths per year. In addition, smoking is considered the largest risk factor for the development of neoplasms and is associated with complications of chronic diseases, even in young people (INCA – Instituto

Nacional de Câncer (Inca/MS), n.d.; PAHO - Pan American Health Organization, 2019; WHO – World Health Organization, 2014, 2021).

Tobacco consumed in different forms is associated with the development of oral cancer, with squamous cell carcinoma (SCC) being the most prevalent (Brentani & Anelli, 2003; INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017). The risk of developing this cancer is 4 to 15 times higher among smokers (Duarte, 2016; Le Campion et al., 2016), as tobacco smoke contains carcinogenic agents such as nitrosamines and polycyclic hydrocarbons which, when in contact with the oral mucosa and associated with thermal aggression, cause changes that favor malignant transformation (INCA, 2018; Thomson, 2013; Vieira; Aguiar; Souza, 2015).

An increase in hookah use is being observed in Brazil, especially among young people, since the addition of flavoring enhancers and flavoring agents to the tobacco makes the product more palatable (De Araujo, 2016; INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017; Maziak et al., 2015; WHO – World Health Organization, 2011, 2014). Although particularly young people believe it to be less harmful to health because a water filter is used, several studies indicate that the consumption of hookah is more harmful than that of conventional cigarettes. Another reason for this belief of less damage is the lower frequency of use compared to conventional cigarettes, which makes users think that they are not dependent on tobacco (De Araujo, 2016; Souza et al., 2018; WHO – World Health Organization, 2021). Data from the National Health Survey on the proportion of users according to frequency of use reveal that 71.8% of users consume hookah monthly, 25.6% weekly, and 2.6% daily (INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017).

Saliva is an essential aqueous fluid present in the oral cavity. It is produced by the major and minor salivary glands and is composed of about 99% water, in addition to organic and inorganic compounds such as electrolytes, enzymes, and proteins. Its composition can vary from individual to individual depending on hormonal changes, medication use, and habits such as smoking and alcohol consumption (Kaluarachchi et al., 2016b). The use of saliva as a diagnostic tool has advantages, including its non-invasive collection and good acceptance by the patient(Kaluarachchi et al., 2016b; Navale et al., 2023b).

The natural or innate immunity is responsible for the defense against microorganisms and is composed of physical and cellular barriers that elicit a response mediated by acute-phase proteins, cytokines, and cells (monocytes, macrophages, granulocytes, natural killer cells, lymphocytes, and dendritic cells). This immune response is able to combat infections and to induce acquired immunity. Cytokines are signaling molecules that aid the innate immunity.

They are the starting point for immune responses mediated by lymphocytes and specific antigens, whose characteristic is that they remain unchanged even after successive encounters with the same antigen (Abbas, 2019; Gorczynski & Stanley, 2001; Roitt et al., 2003). On the other hand, the acquired or specific immunity is a humoral response (production of immunoglobulins) (Abbas, 2019; Roitt et al., 2003). Cytokines are a heterogeneous group of proteins capable of modifying the synthesis of RNA and proteins in different cells of the body. A cytokine produced during the course of an inflammatory response is defined as proinflammatory. Proinflammatory cytokines are important for the induction of T helper (Th) cell responses whose subsets, known as Th1 and Th2, generate different expression profiles. A Th1 response induces the expression of IL-2 and IL-12, while Th2 cells express IL-4, IL-5, IL6, IL-10 and IL-13, in addition to stimulating the humoral immune response (Liskmann et al., 2006; Okada & Murakami, 1998.; Sheeran & Hall, 1997).

The human klotho protein plays a role in protecting against aging by safeguarding cells against inflammation and oxidative damage. In the context of smoking, there is limited literature available, with conflicting expression results. However, serum levels of α-klotho may be associated with the compensatory response to stress (Kamizono et al., 2018c; Verde et al., 2017b; Yao et al., 2022b).

In view of the above considerations, the aim of the present study was to evaluate the expression of salivary cytokines in hookah and conventional cigarette smokers.

MATERIALS AND METHODS

Study design and participants

The study was approved by the Ethics Committee of Universidade de Mogi das Cruzes (Opinion number: 2.627.150).

Whole saliva samples were collected from the following groups:

1) cigarette group: individuals who regularly smoked conventional cigarettes only, at least 10 cigarettes per day, for 2 years;
2) hookah group: individuals who regularly smoked hookah only, at least two sessions per week (Eker et al., 2016), for 2 years (Udayashankar et al., 2021);
3) control group: individuals who did not smoke and had not been regular passive smokers throughout their lives, as self-reported.

Healthy young adults of both sexes aged 18 to 40 years, who regularly smoked either hookah or conventional cigarettes only or were non-smokers, were included. The exclusion

criteria were a personal history of malignant oral neoplasms, visible clinical signs of any alteration at the site evaluated(Lima et al., 2010), weekly consumption of more than three doses of alcoholic beverages, illicit drug use, and presence of any systemic disease (Udayashankar et al., 2021).

All patients received information about the objective and conditions of the study and signed the free informed consent form. In addition, the patient underwent intra- and extraoral clinical examination and answered a questionnaire applied by interview about their general health condition.

Analysis of smoking and drinking profile

For analysis of the smoking profile, the participants were asked about current cigarette consumption, age at smoking onset, type and number of cigarettes, and smoking duration. The Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) was also applied to assess the risk of alcohol use. This tool consists of 10 scored questions that identify four patterns of alcohol consumption: probable dependence, harmful drinking, risky drinking, and low risk (Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM, 2011).

Collection and analysis of saliva samples

All samples were collected between 10:00 and 12:00 h to minimize variability in salivary components. To reduce contamination with oral debris, 10 minutes before collection, the participants rinsed their mouth with distilled water for 1 minute. Samples were collected at least 12 h after consuming alcohol and the patients were instructed not to eat any food or brush their teeth for a minimum period of 2 h prior to saliva collection.

The patients remained seated upright in a ventilated and calm environment. Unstimulated saliva was collected by expectoration into a disposable plastic tube (Falcon®, Rio de Janeiro) according to the method modified from Navazesh et al. (2008). Patients expectorated 3 mL of saliva into the plastic tubes immersed in ice. After collection, the tubes were hermetically sealed, immediately transported to the laboratory, and stored at -80^{o}C until the time for analysis.

Evaluation of salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression

1 μL of homogenized pure saliva was pipetted onto a solid plate in order to enable antigen-antibody binding. The levels of proinflammatory cytokines (IL-2, IL-1β, IL-6, TNF-α), growth factors (VEGF), and Klotho protein were analyzed by enzyme-linked immunosorbent

assays (ELISA). The Human ELISA MAX™ Deluxe BioLegend (BioLegend, Inc., San Diego, USA) and R&D DuoSet kits (R&D SystemsMinneapolis, USA) were used according to manufacturer instructions, as standardized by the Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology of UNIFESP. For each mediator evaluated, 100 µL of whole saliva from each patient was used ((Brandao-Rangel et al., 2021). The samples were read on the SpectraMax i3 multi-mode platform (Molecular Devices).

Statistical analysis

The GraphPad Prism 5.0 software was used for statistical analysis. The Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test were applied to calculate the significance of comparisons between groups. Spearman correlation analysis was performed to examine the association of cytokines with the clinical data. ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were constructed to determine the area under the curve (AUC), the sensitivity and specificity of salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

Eighty-five samples were analyzed, including 33 from hookah smokers, 22 from cigarette smokers, and 30 from non-smokers (control group). In the present study, the population studied was the same as in a study previously published by our group (Sepulveda Inostroza et al., 2024) and table 1 shows the age, sex, tobacco consumption, smoking duration, and alcohol-related risk score of the participants. The Kruskal-Wallis test revealed significantly higher salivary levels of the inflammatory cytokines IL-2 ($p<0.0001$), IL-6 ($p<0.0001$), IL-1β ($p<0.0001$), and TNF-α ($p<0.0001$) among hookah and conventional cigarette smokers compared to the control group. Salivary levels of VEGF ($p<0.0001$) and Klotho protein ($p<0.0001$) were found to be reduced in the saliva of smokers. Figure 1 illustrates the distribution of expression of the cytokines studied in each group and the statistical significance assessed by Dunn's multiple comparison test. Table 2 shows the level of protein expression in the groups studied.

Tables 3 show the correlation between the expression of the cytokines studied and the clinical findings in the hookah and cigarette groups, respectively, using Spearman's correlation test. There was only a statistically significant correlation between age and IL-1β expression in the hookah group (Spearman correlation coefficient=-0.465183, p=0.0012) and between age

and Klotho protein in the cigarette group (Spearman correlation coefficient=-0.4552852, p=0.038).

Figure 2 demonstrates the ROC curve analysis for distinguishing the Hookah group from the Control group using salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. For IL-2: Sensitivity of 87,5%, specificity of 83.27% (AUC=0.975 (CI95% 0.946-1); p<0.001). For IL-6: Sensitivity of 78,1%, specificity of 75% (AUC=0.792 (CI95% 0.6740.910); P<0.001). For IL1-β: Sensitivity of 74,2%, specificity of 96,3% (AUC=:0.898 (CI95% 0.817-0.980); P<0,001). For TNF-α: Sensitivity of 100%, specificity of 100% (AUC=1 (CI95% 1-1); P<0,001). The ROC curve analysis for distinguishing the control group from the hookah group using salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. For VEGF: Sensitivity of 100%, specificity of 96,9% (AUC=0.998 (CI95% 0,992-1); P<0,001). For Klotho: Sensitivity of 89,7%, specificity of 77,4% (AUC=0.886 (CI95% 0.802-0.970); P<0,001).

DISCUSSION

Smoking causes alterations in salivary composition (Simsek Ozek et al., 2016; Sugimoto et al., 2013). The agents produced by burning tobacco can interact in the oral cavity, causing cellular changes (Da Silva et al., 2014; Semlali et al., 2011) that can induce the initiation and development of diseases such as oral cancer (Semlali et al., 2011).

Saliva as a liquid biopsy is useful for the investigation of biochemical, immunological, genetic and molecular biomarkers in genomic, proteomic, epigenomic, microbiomic and metabolomic approaches used to study different diseases in humans. Despite some limitations such as differences in sampling, storage and molecular analysis methods among studies and the need for optimization, standardization and validation of the analyses, considering that its collection is non-invasive, painless and easy, saliva can be used as an alternative approach for the screening, early diagnosis, and post-treatment monitoring of patients with head and neck cancer (Kumar; Gupta; Das, 2024).

The aim of the present study was to analyze the expression of salivary cytokines in hookah and conventional cigarette smokers. This assessment is relevant since smoking poses health risks (Taati; Arazi; Suzuki, 2020) because of the presence of different toxic substances in the products consumed (INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2017), which have been associated with oral carcinogenesis (Amer; Waguih; ElRouby, 2019). Furthermore, tobacco consumption alters the buffering capacity of saliva (Khemiss; Khelifa; Saad, 2017) and is associated with elevated levels of heavy metals (Khabour et al.,

2018), as well as with genotoxic (Eker; Koyuncu; Diler, 2016) and epigenetic tissue alterations (Sabi et al., 2020). Regarding the dosage, frequency and method of smoke inhalation, the extent of exposure to carcinogens varies among different forms of smoking (Tomar et al., 2019).

Saliva is a promising biological sample that has several advantages over other materials such as blood or tissue samples because of its simple, convenient and non-invasive collection, in addition to its lower costs (Fuller et al., 2015; Kong & Birkeland, 2021). Additionally, a significant relationship between inhaled cigarette smoke and salivary components has been reported, considering that saliva is one of the first biological fluids exposed to the toxicity of inhaled smoke, a fact that renders saliva a reliable and consistent diagnostic tool (Nagler, 2007).

Cytokines are soluble low-molecular-weight polypeptides that participate in inflammation, apoptosis, host resistance, and immune responses. Their activity is dysregulated during inflammatory processes and carcinogenesis. The binding of cytokines to specific receptors on cells can trigger different cellular activities such as cell growth, differentiation, or death (Babiuch et al., 2020; Deepthi; Nandan; Kulkarni, 2019; Goldoni et al., 2021; Katakura et al., 2007b). Proinflammatory mediators such as IL-1β, IL-2, IL-6, and TNF-α are involved in the growth and proliferation of immune and tumor cells, in addition to increasing immunological surveillance. These cytokines are elevated in the saliva of patients with oral cancer when compared to control groups and may serve as indicators of malignant transformation. On the other hand, anti-inflammatory mediators such as VEGF neutralize the proliferative potential of proinflammatory cytokines.

The present study evaluated saliva from patients in the process of carcinogenesis due to tobacco consumption. Higher salivary levels of IL-1β, IL-6, and TNFα were observed in hookah and conventional cigarette smokers compared to the control group.

Smoking is associated with an increase in proinflammatory mediators in the oral environment (Faridoun et al., 2021; Ganesan et al., 2020; Mokeem et al., 2018; Sheth et al., 2018). It is important to note that changes in cytokine production induced by the consumption of stimulants such as tobacco can lead to long-term alterations in oral immunity that facilitate microbial dysbiosis (Sheth et al., 2018). Faridoun et al. (2021), Ganesan et al. (2020), and Mokeem et al. (2018) found higher salivary levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in conventional cigarette and hookah smokers compared to non-smokers. Even higher levels of IL-1β and IL-6 and of TNF-α were detected in users of electronic cigarettes byFaridoun et al., 2021 and byGanesan et al. (2020), respectively. Miluna et al. (2022) demonstrated elevated levels of IL1β, IL-6 and TNF-α in users of smokeless tobacco products. TNF-α levels are potential salivary

biomarkers for evaluating oral effects in users of snuff, a powder extracted from tobacco leaves (Muhammad et al., 2021).

Alqahtani et al. (2019) observed significantly higher levels of IL-6, IL-1β and TNF-α in peri-implant sulcus fluid of conventional cigarette, electronic cigarette and hookah smokers when compared to the levels seen in non-smokers. The authors found no statistically significant difference in the levels of these proinflammatory cytokines when conventional cigarette and hookah smokers were compared. However, analysis of salivary levels in the present study showed higher expression of these cytokines in saliva of hookah smokers.

Several studies have reported elevated levels of these cytokines in patients with oral cancer (Babiuch et al., 2020; Brailo et al., 2012; Duffy et al., 2008; Lee et al., 2018; Lisa Cheng et al., 2014; Panneer Selvam & Sadaksharam, 2015; Singh et al., 2020). Lee et al. (2018) compared plasma and saliva cytokine concentrations between patients with different stages of oral SCC and observed an increase in cytokines in the group with oral SCC, with higher salivary levels of IL-6 and TNFα in early oral SCC (stages I and II) when compared to the control group and the group with stage III and IV disease. The authors concluded that the continuous expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines may enhance the progression of oral SCC and highlighted the greater diagnostic efficacy of saliva compared to plasma. Babiuch et al. (2020) reported higher IL-6 and TNF-α levels in saliva samples of patients with different stages of oral SCC. Other authors (Panneer Selvam & Sadaksharam, 2015; Lisa Cheng et al., 2014) also observed a significant increase in salivary IL-6 in patients with oral SCC, while Singh et al. (2020)reported an increase in IL-1β in patients with oral SCC compared to the control group. Furthermore, Duffy et al. (2008) concluded that pretreatment serum IL-6 levels are a significant predictor of recurrence and poor survival in patients with head and neck cancer. Brailo et al. (2012) and Sharma et al. (2011) demonstrated a significant increase in inflammatory cytokines in saliva during carcinogenesis and suggested the measurement of these salivary cytokines to monitor malignant transformation of oral leukoplakia.

In the present study, salivary VEGF levels were found to be reduced in the saliva of smokers. In contrast, Sgambato et al., 2018, analyzing the expression of inflammatory mediators in plasma samples of smokers, found elevated VEGF levels. Argiris et al. (2011) studied biomarkers in serum and tissue of patients with advanced head and neck cancer (stages III and IV) and associated serum VEGF levels with the tumor response, highlighting this cytokine as a potentially useful prognostic marker in the treatment of head and neck cancer. Kyzas et al. (2005), Chuang et al. (2006), and Cheng et al. (2011) reported an association between VEGF and the progression and prognosis of oral SCC, with the observation of higher levels of this

cytokine in advanced tumors. Shao et al. (2008) found a significant correlation between VEGF levels and tumor site, clinical stage, lymph node involvement, recurrence, and distant metastases.

Smoking is considered an important accelerator of aging, a process that involves complex mechanisms and diverse pathogeneses (Neyra; Hu; Moe, 2021). Klotho is an antiaging protein with anti-inflammatory activity (Li et al., 2015), whose serum levels decrease with aging (Kuro-o, 2019a). This protein has been associated with reduced apoptosis of malignant cells (Elashoff et al., 2012). Klotho protein is involved in fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I receptor signaling pathways(Elashoff et al., 2012).

In the present study, salivary levels of Klotho protein were lower in smokers. This result agrees with the findings of Wang et al. (2014) and Krick et al. (2018). The authors observed that Klotho was downregulated by cigarette smoke in the airway epithelium of a murine COPD model and in cultured human bronchial epithelial cells.

Verde et al. (2017) highlighted the paradoxical role of Klotho expression. The authors hypothesized that the effect of aging caused by smoking might be mediated by a decrease in the Klotho antiaging factor. However, they observed that serum levels were upregulated in heavy smokers and concluded that Klotho acts as an anti-inflammatory molecule in this case and its increase would be a compensatory response to the stress of smoking. In agreement with this suggestion, Yao et al. (2022) demonstrated an increase in serum Klotho levels with increasing serum cotinine levels when this metabolite was ≥130 ng/mL; on the other hand, Klotho levels decreased when this metabolite was <130 ng/mL. The authors speculated that this conflicting result may be a threshold effect resulting from a compensatory response to smoke exposure. According to Kamizono et al. (2018), whose findings support the conclusion that smoking cessation resulted in a significant reduction in serum klotho levels, evidencing an increase in Klotho as a compensatory response to the stress caused by smoking.

As mentioned above, salivary levels of Klotho protein were lower in hookah and conventional cigarette smokers compared to the control group. This finding can be explained by the fact that our sample consisted of young patients (21, 18 and 29 years, respectively), with a mean number of hookah sessions per week of 5.68 and a mean number of cigarettes smoked per day of 14.59. It is important to note that this is the first study evaluating salivary levels of Klotho in healthy smokers.

There is a strong connection between smoking and chronic inflammation in human tissues (Dongiovanni et al., 2023). The consumption of these products exposes the body to oxidative molecules, toxins, and traces of microbial cell components, triggering an

inflammatory response (Lee; Taneja; Vassallo, 2012). Biomarkers such as IL-1β, IL-6, CRP, and fibrinogen are identified as sensitive indicators of inflammation induced by cigarette smoke (Elisia et al., 2020), along with IL-8, IL-6, and TNFα (Strzelak et al., 2018). In this study, IL2, IL-6, IL1-β, and TNF-α were identified as highly sensitive and specific biomarkers for detecting inflammation in hookah smokers, distinguishing them from the control group. Additionally, VEGF and Klotho were effective in distinguishing the control group from the hookah group.

In this article, we aim to contribute to the understanding of this growing group of smokers. We found no studies in the literature that address the salivary inflammatory mediators and Klotho protein assessment in hookah users. However, for a more comprehensive evaluation, it would be important to analyze anti-inflammatory mediators such as IL-10 and IL1Ra, which were not assessed due to laboratory limitations.

CONCLUSION

The results suggest that the salivary environment of hookah and conventional cigarette smokers can be characterized by elevated levels of proinflammatory mediators. Furthermore, the lower expression of Klotho protein in the saliva of smokers suggests potential premature aging of cells.

FUNDING: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants #2018/23248-1 and #2012/15165-2) for financial support.

DECLARATIONS OF INTEREST: None

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

PRESENTATION

We declare that this study has already been presented at the 50° Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral, 2024. The abstract will be published in Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology.

REFERENCES

ABBAS, A. K. ,. Lichtman, A. H. ,. &. Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ª Ed. ed. *[S.l.]*:

Elsevier, 2019.

ABBAS, Abul K. *et al.* **Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospectsSci. Immunol**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://immunology.sciencemag.org/>.

ABRAHAM, Carmela R.; LI, Anne. **Aging-suppressor Klotho: Prospects in diagnostics and therapeutics**. **Ageing Research Reviews**Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2022.

ABRAMOVITZ, Lilach *et al.* KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4254–4266, 1 jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-RDC n. 46/2009**.

AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745–756, set. 2003.

AGGARWAL, Bharat B.; GUPTA, Subash C.; KIM, Ji Hye. **Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey**. **Blood**American Society of Hematology, , 19 jan. 2012.

AGGARWAL, Divya; LIMDI, Jimmy K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 1, p. 13–19, 11 jan. 2015.

ALMEIDA, D. '. *et al.* **Lesões Pulmonares Associadas ao Uso do Cigarro Eletrônico**. *[S.l.: S.n.]*.

AL-MOMANY, Nairooz H. *et al.* Analysis of Factors That Interrupt With INR Control in the First Anticoagulation Clinic Monitoring Jordanian Patients. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 25, 13 ago. 2019.

ALQAHTANI, Fawaz *et al.* Comparison of cotinine levels in the peri-implant sulcular fluid among cigarette and waterpipe smokers, electronic-cigarette users, and nonsmokers. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 21, n. 4, p. 702–707, 2019.

ALVES, Kaoane Taynã; SEVERI, Letícia Sarturi Pereira. Componentes salivares associados à

prevenção da cárie dental revisão de literatura / Salivary components associated with prevention of dental caries literature review. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo** , 2016.

AMER, Hatem W.; WAGUIH, Hend M.; EL-ROUBY, Dalia H. Development of field cancerization in the clinically normal oral mucosa of shisha smokers. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 17, n. 1, p. 39–45, 2019.

APTE, Ron N.; VORONOV, Elena. Interleukin-1—a major pleiotropic cytokine in tumor–host interactions. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, n. 4, p. 277–290, ago. 2002.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011a.

ARGIRIS, Athanassios *et al.* Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 961–966, 2011b.

ASADULLAH, K. *et al.* IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 783–794, 15 fev. 1998.

AZIMI-NEZHAD, Mohsen. **Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathologyReports of Biochemistry & Molecular Biology**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.RBMB.net>.

AZIZ, S. A.; SRAMKOSKI, R. M.; CALIGIURI, M. A. Elevated IL-10 production by oral cancer cells
induced by tobacco-specific carcinogen: implications for immune evasion. **Tobacco and Cancer**, 2015.

AZIZ, Salman *et al.* Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 7, p. 318–328, 9 ago. 2015.

BABIUCH, Karolina *et al.* Evaluation of proinflammatory, nf-kappab dependent cytokines: Il1α, Il-6, Il-8, and TNF-α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2020.

BAGAN, Leticia *et al.* Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 4, p. 737–743, 1 maio 2016.

BALKWILL, Frances. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 3 maio 2009.

BARRINGTON-TRIMIS, Jessica L.; LEVENTHAL, Adam M. Adolescents' Use of "Pod Mod" ECigarettes — Urgent Concerns. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 12, p. 1099–1102, 20 set.
2018.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021a.

BARUFALDI, Laura Augusta *et al.* Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6089–6104, 2021b.

BATISTA, Bianca G. *et al.* **USO INDISCRIMINADO DO CIGARRO ELETRÔNICO E SEUS MALEFÍCIOS AO TRATO RESPIRATÓRIO**. *[S.l.: S.n.]*.

BEHAR, Rachel Z.; HUA, My; TALBOT, Prue. Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 10 fev. 2015.

BEKLEN, A.; UCKAN, D. Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 25–34, 30 jan. 2021.

BERNARDES-SOUZA, Breno *et al.* Facial-aging mobile apps for smoking prevention in secondary schools in Brazil: Appearance-focused interventional study. **Journal of Medical Internet Research**, v. 20, n. 7, p. 1–18, 2018.

BERTONI, Neilane *et al.* Electronic cigarettes and narghile users in Brazil: Do they differ from cigarettes smokers? **Addictive Behaviors**, v. 98, 1 nov. 2019.

BERTONI, Neilane; SZKLO, André Salém. Electronic nicotine delivery systems in Brazilian state

capitals: Prevalence, profile of use, and implications for the National Tobacco Control Policy. **Cadernos de Saude Publica**, v. 37, n. 7, 2021.

BINSHABAIB, Munerah S. *et al.* Peri-implant clinical and radiographic status and whole salivary cotinine levels among cigarette and waterpipe smokers and never-smokers. **Journal of Oral Science**, v. 60, n. 2, p. 247–252, 1 jun. 2018.

BITTMANN, Stefan. The Role of Klotho in Pediatric Premature Aging Diseases. **American Journal of Biomedical Science & Research**, v. 19, n. 3, p. 345–354, 10 jul. 2023.

BLACHMAN-BRAUN, Ruben *et al.* **Hookah, is it really harmless? Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 2014.

BLAKE, David J. *et al.* Soluble extracellular Klotho decreases sensitivity to cigarette smoke induced cell death in human lung epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1647–1652, 1 out. 2015.

BOSTANCI, Nagihan *et al.* Salivary proteotypes of gingivitis tolerance and resilience. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 11, p. 1304–1316, 1 nov. 2020.

BOU FAKHREDDINE, Hisham M.; KANJ, Amjad N.; KANJ, Nadim A. **The growing epidemic of water pipe smoking: Health effects and future needs**. **Respiratory Medicine**W.B. Saunders Ltd, , 1 set.
2014.

BOYKAN, Rachel; GONIEWICZ, Maciej L.; MESSINA, Catherine R. Evidence of Nicotine Dependence in Adolescents Who Use Juul and Similar Pod Devices. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 12, p. 2135, 17 jun. 2019.

BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 27 jan. 2008.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis

factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012a.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 17, n. 1, jan. 2012b.

BRAILO, Vlaho *et al.* Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 17, n. 1, p. e10-5, 1 jan. 2012c.

BRANDAO-RANGEL, Maysa Alves Rodrigues *et al.* Pulmonary function changes in older adults

with and without metabolic syndrome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

BRENTANI, Maria Mitzi; ANELLI, Tânia de Fátima Moredo. **Bases da Oncologia**. São Paulo: *[S.n.]*.

BRIGGS, K.; BELL, C.; BREIK, O. **What should every dental health professional know about electronic cigarettes? Australian Dental Journal**John Wiley and Sons Inc, , 1 set. 2021.

BUCHANAN, Nicholas D. *et al.* Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2020a.

BUCHANAN, Sarah *et al.* **Klotho, Aging, and the Failing Kidney**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 27 ago. 2020b.

CAO, Dazhe James *et al.* **Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury**. **Journal of Medical Toxicology**Springer, , 1 jul. 2020.

CARSWELL, E. A. *et al.* **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage) Zymosan (from Saccharomyces cerviiae) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W**. *[S.l.: S.n.]*.

CARVALHO, Bruna Fernandes do Carmo *et al.* Salivary Metabolic Pathway Alterations in Brazilian E-Cigarette Users. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11750, 1 nov. 2024.

CASTAGNOLA, M. *et al.* **Potential applications of human saliva as diagnostic fluid Le potenziali applicazioni della saliva umana come fluido diagnosticoACTA oTorhinolAryngologiCA iTAliCA**. *[S.l.: S.n.]*.

CASTELBLANCO, Esmeralda *et al.* Association of α-klotho with subclinical carotid atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 21, n. 1, p. 207, 11 out. 2022.

CAVALCANTE, Tânia Maria *et al.* Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e percepção de risco no Brasil: Resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. **Cadernos de Saude Publica**, v. 33, p. 1–11, 2017.

CHALON, Stephan *et al.* Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 67, n. 4, p. 391–397, 2000.

CHAND, Hitendra S. *et al.* Pulmonary toxicity and the pathophysiology of electronic cigarette,
or vaping product, use associated lung injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2020.

CHATHAM-STEPHENS, Kevin *et al.* **Morbidity and Mortality Weekly Report Characteristics of Hospitalized and Nonhospitalized Patients in a Nationwide Outbreak of E-cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury-United States, November 2019**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/assets/2019-Lung->.

CHAVES VIEIRA, Ângela; DA SILVA TEIXEIRA AGUIAR, Zildeny; SOUZA, Francielle Vieira. **TABAGISMO E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER BUCAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA SMOKING AND ITS RELATIONSHIP WITH ORAL CANCER: A LITERATURE REVIEW**. *[S.l.: S.n.]*.

CHEN, Chih-Jung *et al.* High expression of interleukin 10 might predict poor prognosis in early
stage oral squamous cell carcinoma patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 415, p. 25–30, jan. 2013.

CHEN, Z.; MALHOTRA, P. S.; THOMASETAL, G. R. Expressionofpro inflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer,. *In*: **Clinical Cancer Research**. *[S.l.: S.n.]*. v. 5 p. 1369–1379.

CHENG, Shih Jung *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 50–57, 2011.

CHIAPPIN, Silvia *et al.* **Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation**. **Clinica Chimica Acta**, ago. 2007.

CHUANG, Hui Ching *et al.* High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. **Laryngoscope**, v. 116, n. 7, p. 1175–1179, jul. 2006.

CICHOŃSKA, Dominika *et al.* Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 22, 12 nov. 2019.

CLARK, Cheryl A. *et al.* Curcumin inhibits carcinogen and nicotine-induced mammalian target of rapamycin pathway activation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 12, p. 1586–1595, dez. 2010.

DA SILVA, André Luiz Oliveira; MOREIRA, Josino Costa. The ban of eletronic cigarettes in brazil: Success or failure? **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 3013–3024, 1 ago. 2019.

DA SILVA LOPES III, Adair; CORDEIRO BARBOSA FILHO, Valter. **Valter Cordeiro Barbosa Filho I Wagner de Campos II Prevalence of alcohol and tobacco use among Brazilian adolescents: a systematic review Prevalência de consumo de álcool e tabaco entre adolescentes brasileiros: revisão sistemáticaRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

DA SILVA MACHADO BARRADAS, Ariel *et al.* **Os riscos do uso do cigarro eletrônico entre os jovens The risks of using electronic cigarettes among young people Los riesgos de consumir cigarrillos electrónicos entre los jóvenesGlob Clin Res**. *[S.l.: S.n.]*.

DA SILVA, Sandra Tavares *et al.* **Combate ao tabagismo no Brasil: A importância estratégica das ações governamentais**. **Ciencia e Saude Coletiva**, fev. 2014.

DAWES, B. Y. C.; WES, C. D. A. Biology, of 1974). p. 535–548, 1975.

DE ARAUJO, Alberto José. **Perguntas & Respostas: Narguilé ou Cachimbo de água SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**. *[S.l.: S.n.]*.

DE LIMA. delima2003. 2003.

DEEPTHI, G.; NANDAN, S. R. K.; KULKARNI, Pavan G. Salivary tumour necrosis factor-α as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 7, p. 2087–2093, 2019.

DIKOVA, Valentina; JANTUS-LEWINTRE, Eloisa; BAGAN, Jose. Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1658, 13 abr. 2021.

DITTRICH SANTOS, Fabiane *et al.* **São Paulo-BrasilArq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol**. *[S.l.: S.n.]*.

DONATE-CORREA, Javier. Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 351, 2015.

DONGIOVANNI, Paola *et al.* **Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation**. **International Journal of Oral Science**Springer Nature, , 1 dez. 2023.

DUARTE, Nathalia Camargo. **Perfil dos pacientes com câncer de boca do Núcleo de Cirurgia de Cabeça e Pescoço HU/UFSC e encaminhados para suporte odontológico no Núcleo de Odontologia Hospitalar HU/UFSC"**. *[S.l.: S.n.]*.

DUFFY, Sonia A. *et al.* Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 750–757, 15 ago. 2008.

EKER, Ebru Derici *et al.* Determination of genotoxic effects of hookah smoking by

micronucleus and chromosome aberration methods. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 4490–4494, 21 nov. 2016.

EKER, Ebru Derici; KOYUNCU, Hayri; DILER, Songul Budak. Determination of Genotoxic Effects

of Hookah Smoking by Micronucleus and Chromosome Aberration Methods. p. 4490–4494, 2016.

ELASHOFF, David *et al.* Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 4, p. 664–672, abr. 2012.

EL-HAJJ, Maya *et al.* Cigarette and waterpipe smoking are associated with the risk of stroke in Lebanon. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 1, p. 62–70, 2019.

ELISIA, Ingrid *et al.* The effect of smoking on chronic inflammation, immune function and blood cell composition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

EPSTEIN SHOCHET, Gali *et al.* Fibroblast paracrine TNF-α signaling elevates integrin A5 expression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, 19 jun. 2017.

ESTEBAN-LOPEZ, Maria *et al.* Health effects and known pathology associated with the use of E-cigarettes. **Toxicol Rep.**, p. 1357–1368, 2022.

ETTER, Jean François. Levels of saliva cotinine in electronic cigarette users. **Addiction**, v. 109, n. 5, p. 825–829, 2014.

FARIDOUN, Afnan *et al.* Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: A cross-sectional study. **Oral Diseases**, v. 27, n. 2, p. 277–279, 1 mar. 2021.

FERRARI, Elena *et al.* Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6795, 24 jun. 2021.

FILIPPIDIS, Filippos T. *et al.* Two-year trends and predictors of e-cigarette use in 27 European Union member states. **Tobacco Control**, v. 26, n. 1, p. 98–104, 1 jan. 2017.

FOUNTOULAKIS, Nikolaos *et al.* Reduced Levels of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline in Type 2 Diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 5, p. 2026–2032, 1 maio 2018.

FUKAWA, Yuki *et al.* IL-1 Generated by Oral Squamous Cell Carcinoma Stimulates TumorInduced and RANKL-Induced Osteoclastogenesis: A Possible Mechanism of Bone Resorption Induced by the Infiltration of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v.
24, n. 1, 1 jan. 2023.

FULLER, Colin *et al.* Adjunctive diagnostic techniques for oral lesions of unknown malignant potential: Systematic review with meta-analysis. **Head and Neck**, v. 37, n. 5, p. 755–762, 1 maio 2015.

GANAPATHY, Vengatesh *et al.* Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

GANESAN, Sukirth M. *et al.* **Adverse effects of electronic cigarettes on the disease-naive oral
microbiome**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://advances.sciencemag.org/>.

GLASSER, Allison *et al.* Patterns of E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: Review of the Impact of E-Cigarettes on Cigarette Smoking. 2018.

GLOGAUER, Judah E. *et al.* Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 11, p. 1218–1226, 1 nov. 2015.

GOERTZEN, Cameron *et al.* **Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasionOncotarget**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.oncotarget.com>.

GOLDONI, Riccardo *et al.* **Malignancies and biosensors: A focus on oral cancer detection through salivary biomarkers**. **Biosensors**MDPI, , 1 out. 2021.

GOMES, Luciana Carneiro *et al.* REVISÃO DE LITERATURA: CÂNCER DE BOCA DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS LITERATURE REVIEW: DIAGNOSTIC MOUTH CANCER AND ASSOCIATED RISK FACTORS. **Revista Interdisciplinar em Saúde, Cajazeiras**, v. 5, n. 4, p. 655–670, 2018.

GORCZYNSKI, R.; STANLEU, J. **Imunologia Clínica**. Rio de Janeiro: Reichmann, 2001.

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Critical review in oral biology & medicine: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 143–153, fev. 2011.

GREBENCIUCOVA, Elena; VANHAERENTS, Stephen. **Interleukin 6: at the interface of human health and disease**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media SA, , 2023.

GREENFIELD, Ellen *et al.* Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. **ACS Omega**, v. 8, n. 40, p. 36845–36855, 10 out. 2023.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, mar. 2010.

GUO, Jiehong; HECHT, Stephen S. DNA damage in human oral cells induced by use of e-cigarettes. **Drug Test Anal**, p. 1189–1197, 2023.

HAMMAL, Fadi *et al.* "Herbal" but potentially hazardous: an analysis of the constituents and smoke emissions of tobacco-free waterpipe products and the air quality in the cafés where they are served. *[S.d.]*.

HAMMOND, David *et al.* USE OF JUUL E-CIGARETTES AMONG YOUTH IN THE UNITED STATES.
2018.

HASTURK, Hatice; KANTARCI, Alpdogan; VAN DYKE, Thomas E. Paradigm shift in the pharmacological management of periodontal diseases. *In*: **Periodontal Disease**. *[S.l.]*: S. Karger AG, 2011. v. 15 p. 160–176.

HELEN, Gideon St *et al.* Nicotine and carcinogen exposure after water pipe smoking in hookah
bars. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 2014.

HESS, Catherine Ann *et al.* E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. **Environmental Research**, v. 152, p. 221–225, 1 jan. 2017.

HILTON, Robert *et al.* **E-cigarettes and Vaping Associated Lung Injury: A Case Series and Brief Review**. **American Journal of the Medical Sciences**Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

HO, Ming Yi *et al.* TNF-α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3β-dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 1109–1119, ago. 2012.

HODGE, D. R.; PENG, B.; CHERRY, J. C. "Interleukin6supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter meth ylation. **Cancer Research**, v. 65, p. 4673–4682, 2005.

HOYER, Katrina K. et al. **Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease**. *[S.l.: S.n.]*.

HUSSAIN, S. Perwez; HARRIS, Curtis C. **Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials**. **International Journal of Cancer**, 1 dez. 2007.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: smokeless tobacco and some tobacco-specific nitrosamines.** Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol89/mono89.pdf.>.

INCA. Causas e prevenção. **Instituto Nacional de Câncer**, p. 1–6, 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tabagismo: Dados Numéricos**. . Acesso em: 31 mar. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Centro colaborador da OPAS/OMS sobre o controle do tabaco**. . Acesso em: 4 abr. 2021.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **legisladores Uso de narguilé : efeitos sobre a saúde , necessidades de pesquisa**. *[S.l.: S.n.]*.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). **Programa Nacional de Controle do Tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Prevalência do tabagismo**.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Convenção-Quadro sobre Controle do Uso do Tabaco (CQCT)**.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Cigarros Eletronicos - O que Sabemos?**

INVERNIZZI, Giovanni. **Persistence of systemic inflammation in COPD in spite of smoking cessation La persistenza dell'infiammazione nella BPCO nonostante la cessazione dal fumo**. *[S.l.: S.n.]*.

JACOBS, Merel *et al.* IL-10 producing regulatory B cells are decreased in blood from smokers and COPD patients. **Respiratory Research**, v. 23, n. 1, p. 287, 17 out. 2022.

JANEWAY, Charles A. *et al.* O sistema imunológico na saúde e na doença. *In*: **Imunobiologia**. *[S.l.: S.n.]*.

JENSEN, R. P. Integration of Acid–Base and Electrolyte Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 389–392, 22 jan. 2015.

JI, Eoon Hye *et al.* E-cigarette aerosols induce unfolded protein response in normal human oral keratinocytes. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 27, p. 6915–6924, 2019.

JIA, Shiyu *et al.* **Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>.

JITĂREANU, Alexandra *et al.* Electronic Cigarettes' Toxicity: From Periodontal Disease to Oral Cancer. **Applied Sciences**, v. 11, n. 20, p. 9742, 19 out. 2021.

JURETIĆ, M. *et al.* **Short Communication Salivary Levels of TNF-α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions)Folia Biologica (Praha)**. *[S.l.: S.n.]*.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined

with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023– 2043, 1 out. 2016a.

KALUARACHCHI, Manuja R. *et al.* Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. **Bioanalysis**, v. 8, n. 19, p. 2023– 2043, 1 out. 2016b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018a.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018b.

KAMIZONO, Yoko *et al.* Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 35, 1 ago. 2018c.

KANEKO, Naoe *et al.* The role of interleukin-1 in general pathology. **Inflammation and Regeneration**, v. 39, n. 1, p. 12, 6 dez. 2019.

KASSEM, Nada O. F. *et al.* Urinary NNAL in hookah smokers and non-smokers after attending a hookah social event in a hookah lounge or a private home. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 74–82, 1 out. 2017.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATAKURA, Akira *et al.* **Comparison of Salivary Cytokine Levels in Oral Cancer Patients and Healthy SubjectsBull Tokyo Dent Coll**. *[S.l.: S.n.]*.

KATARINA GUSTAFSSON. **Imperial Tobacco concorda em adquirir a unidade de cigarros eletrônicos da Dragonite**.

KHABOUR, Omar F. *et al.* Plasma and saliva levels of three metals in waterpipe smokers: a case control study. **Inhalation Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 224–228, 2018.

KHEMISS, Mehdi; KHELIFA, Mohamed Ben; SAAD, Helmi Ben. Preliminary findings on the

correlation of saliva pH, buffering capacity, flow rate and consistency in relation to waterpipe tobacco smoking. **Libyan Journal of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 4–11, 2017.

KIM, J. J. *et al.* TNF-α-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1

and Bcl-XL. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420–1434, 5 set. 2010.

KIM, Jae Ho; JENROW, Kenneth A.; BROWN, Stephen L. **Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials**. **Radiation Oncology Journal**Department of Radiation Oncology, , 1 set. 2014.

KINANE. kinane2005. 2005.

KLUMB, Claudete E.; CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo B. **Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóidesRev.bras.hematol.hemoter**. *[S.l.: S.n.]*.

KONG, Lingyi; BIRKELAND, Andrew C. cancers Liquid Biopsies in Head and Neck Cancer: Current State and Future Challenges. 2021.

KORTE, Dina L.; KINNEY, Janet. Personalized medicine: An update of salivary biomarkers for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 26–37, 2016.

KOSMIDER, Leon *et al.* Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine

solvent and battery output voltage. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 16, n. 10, p. 1319–1326, 1 out. 2014.

KRICK, Stefanie *et al.* Fibroblast growth factor 23 and Klotho contribute to airway inflammation. **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 1, 1 jul. 2018.

KRISHNAN, Rajkumar *et al.* Association of Serum and Salivary Tumor Necrosis Factor-α with Histological Grading in Oral Cancer and its Role in Differentiating Premalignant and Malignant Oral Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 17, p. 7141–7148, 15 set. 2014.

KUMAR, Prabhat; GUPTA, Shilpi; DAS, Bhudev C. Saliva as a potential non-invasive liquid

biopsy for early and easy diagnosis/prognosis of head and neck cancer. **Translational Oncology**, v. 40, 1 fev. 2024.

KUMARI, Swati *et al.* **A Review on Saliva-Based Health Diagnostics: Biomarker Selection and Future Directions**. **Biomedical Materials and Devices**Springer Nature, , 1 mar. 2024.

KUNTIC, Ivana *et al.* The role of acrolein for E-cigarette vapour condensate mediated activation of NADPH oxidase in cultured endothelial cells and macrophages. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 475, n. 7, p. 807–821, 7 jul. 2023.

KUO, Wu-Hsien *et al.* Effects of interleukin-10 polymorphisms and smoking on the risk of gastric cancer in Taiwan. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 28, n. 5, p. 967–71, 2014.

KURO, Makoto. **Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing**. **Clinical Science**Portland Press Ltd, , 1 ago. 2021.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O*, Makoto *et al.* **Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageingNATURE**. *[S.l.: S.n.]*.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019a.

KURO-O, Makoto. **The Klotho proteins in health and disease**. **Nature Reviews Nephrology**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2019b.

KUROSU, Hiroshi *et al.* Physiology: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 16 set. 2005.

KYZAS, Panayiotis A. *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 206, n. 2, p. 170–177, jun. 2005.

LAFFER, Björn *et al.* Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 9 out. 2019.

LE CAMPION, Anna Carolina Omena Vasconcellos *et al.* Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 178–184, 2016.

LEE, Chia-Huei *et al.* Interleukin-1 beta transactivates epidermal growth factor receptor via the CXCL1-CXCR2 axis in oral cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38866–38880, 17 nov. 2015.

LEE, J. M. *et al.* **Salivary diagnostics**. *[S.l.: S.n.]*.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. **Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms**. **Journal of Dental Research**, fev. 2012.

LEE, L. T. *et al.* Evaluation of saliva and plasma cytokine biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 6, p. 699–707, 1 jun. 2018.

LEE, Peter N.; COOMBS, Katharine J.; AFOLALU, Esther F. Considerations related to vaping as a possible gateway into cigarette smoking: an analytical review. **F1000Research**, v. 7, p. 1915, 22 jul. 2019.

LEE, Shin Hwa; CHOI, Yung Hyun. Link between Periodontal Disease and Cancer: A Recent Research Trend. **Journal of Life Science**, v. 23, n. 4, p. 602–608, 30 abr. 2013.

LEE, Yu-Hsiang *et al.* **Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases**. *[S.l.: S.n.]*.

LI, Lingling *et al.* Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extract-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27890–27900, 13 nov. 2015.

LIMA, Celina Faig *et al.* Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 441–446, 2010.

LIN, X. *et al.* VEGF mediated signaling in oral cancer. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 62, n. 14, p. 64–68, 30 dez. 2016.

LISA CHENG, Yi-Shing *et al.* Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 7, p. 956–965, jul. 2014.

LISKMANN, Stanislav *et al.* Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 21, n. 4, p. 543–550, jul. 2006.

LIU, Yanqiu; OLSEN, Bjorn R. Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 5, p. 363–368, 4 out. 2014.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–95, ago. 2011.

LOPEZ-LABADY, Jeaneth; BOLOGNA-MOLINA, Ronell; VILLARROEL-DORREGO, Mariana. Expression of Interleukin-1ß and Interleukin-8 in Oral Potentially Malignant Disorders and Carcinomas.
Frontiers in Oral Health, v. 2, 10 set. 2021.

MA, Chuanwei *et al.* Prevalence and trends in tobacco use among adolescents aged 13–15 years in 143 countries, 1999–2018: findings from the Global Youth Tobacco Surveys. **The Lancet Child and Adolescent Health**, v. 5, n. 4, p. 245–255, 1 abr. 2021.

MALAMUD, Daniel. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–178, 2011.

MALEK, Thomas R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 6, p. 961–965, 1 dez. 2003.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

MALTA, Deborah Carvalho *et al.* Mudanças no uso do tabaco entre adolescentes brasileiros e fatores associados: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 29, n. 9, 2024.

MARTINON, Fabio; TSCHOPP, Jürg. Inflammatory Caspases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561–574, maio 2004.

MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. **Tobacco Control**, v. 24, p. i3–i12, 2015.

MAZIAK, Wasim *et al.* The global epidemiology of waterpipe smoking. *[S.d.]*.

MENEZES, Ana M. B. *et al.* **Mental health problems and smoking among adolescents from Southern BrazilRev Saúde Pública**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.scielo.br/rsp>.

MENEZES, Ana Maria Baptista *et al.* Frequência do uso de narguilé em adultos e sua distribuição conforme características sociodemográficas, moradia urbana ou rural e unidades federativas: Pesquisa nacional de saúde (PNS), 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 57–67, 2015.

MIHAILA, Romeo Gabriel; TODOR, Samuel Bogdan. **Bridging Periodontal Disease and Myeloproliferative Neoplasms: The Role of Immune Dysregulation and Inflammatory Mediators**. , 12 nov. 2024.

MILUNA, Sintija *et al.* The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. **Dentistry Journal**, v. 10, n. 8, 1 ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, Stella Martins. . **Quero parar de usar o cigarro eletrônico,**

o que fazer?

MIRBOLOUK, Mohammadhassan *et al.* Prevalence and distribution of e-cigarette use among U.S. adults: Behavioral risk factor surveillance system, 2016. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 7, p. 429–438, 2 out. 2018.

MIRKESHAVARZ, M. *et al.* Interleukin-6 secreted by oral cancer- associated fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 6, n. 10, p. 131–136, 2017.

MISHRA, Aseem *et al.* **Harmful effects of nicotine**. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 mar. 2015.

MODELING, Lagrangian Method *et al.* No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. **Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics**, v. 26, n. 3, p. 1–4, 2019.

MOKEEM, Sameer A. *et al.* Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 61, p. 38–43, 1 jul. 2018.

MOORE, Kevin W. *et al.* Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, abr. 2001.

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. . *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.ibge.gov.br,>.

MORETTI-PIRES, Rodrigo Otávio; CORRADI-WEBSTER, Clarissa Mendonça. Adaptação e validação do Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) para população ribeirinha do interior da Amazônia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, p. 497–509, mar. 2011.

MOTAMAYEL, A. Saliva as a mirror of the body health. **Dentistry**, p. 1–6, 2009.

MUHAMMAD, Waqar *et al.* Article assessment of unstimulated whole salivary tumor necrosis

factor alpha (Tnf-α) and cellular micronuclei levels in snuff (naswar) users and non-users for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 14, 2 jul. 2021.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NACIONAL DE CÂNCER, Instituto; GOMES DA SILVA, José Alencar. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**. *[S.l.: S.n.]*.

NAGLER, R. M. Altered salivary profile in heavy smokers and its possible connection to oral cancer. **The International Journal of Biological Markers**, v. 22, n. 4, p. 274–280, 2007.

NAIK, Pooja; CUCULLO, Luca. **Pathobiology of tobacco smoking and neurovascular disorders: Untied strings and alternative products**. **Fluids and Barriers of the CNS**BioMed Central Ltd., , 31 out. 2015.

NATTO, Suzan; BALJOON, Mostafa; BERGSTRÖM, Jan. Tobacco smoking and periodontal bone height in a Saudi Arabian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 9, p. 1000–1006, set. 2005.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023a.

NAVALE, Archana M. *et al.* Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Current Cancer Drug Targets**, v. 24, n. 1, p. 114–126, 12 maio 2023b.

NAVAZESH, Mahvash; KUMAR, Satish K. S. Measuring salivary flow. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 35S-40S, maio 2008.

NEYRA, Javier A.; HU, Ming Chang; MOE, Orson W. **Klotho in clinical nephrology: Diagnostic and therapeutic implications**. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**American Society of Nephrology, , 1 jan. 2021.

NG, Marie *et al.* Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. **JAMA**, v. 311, n. 2, p. 183–192, 8 jan. 2014.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Vaping Devices (Electronic Cigarettes) DrugFacts**.

O'CONNELL, Grant; GRAFF, Donald W.; D'RUIZ, Carl D. Reductions in biomarkers of exposure (BoE) to harmful or potentially harmful constituents (HPHCs) following partial or complete substitution of cigarettes with electronic cigarettes in adult smokers. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 6, p. 443–454, 23 jul. 2016.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. **CYTOKINE EXPRESSION IN PERIODONTAL HEALTH AND DISEASE**. *[S.l.: S.n.]*.

OLIVEIRA ALVES, Mônica Ghislaine *et al.* Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 130, n. 3, p. 298–305, 1 set. 2020.

OLIVEIRA, Max Moura de *et al.* Características da Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar - PeNSE. **Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 605–616, 1 jul. 2017.

OLIVEIRA-CAMPOS, Maryane *et al.* Risk and protection factors for chronic noncommunicable diseases in adolescents in Brazilian capitals. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 1 jan. 2018.

OPAS/OMS. **Tabaco**.

OSMAN, Tarig A.; COSTEA, Daniela E.; JOHANNESSEN, Anne C. **The use of salivary cytokines as a screening tool for oral squamous cell carcinoma: A review of the literature**. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, maio 2012.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Folha Informativa Tabaco**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5641:folhainformativa-tabaco&Itemid=1097>.

PAHO/OPAS. **Medidas urgentes são necessárias para proteger as crianças e os jovens dos cigarros eletrônicos**.

PALATA, Ondrej *et al.* **Radiotherapy in combination with cytokine treatment**. **Frontiers in Oncology**Frontiers Media S.A., , 2019.

PANATTO, D. *et al.* **Tobacco smoking among students in an urban area in Northern ItalyJ prev med hyg**. *[S.l.: S.n.]*.

PANNEER SELVAM, Niranzena; SADAKSHARAM, Jayachandran. Salivary interleukin-6 in the

detection of oral cancer and precancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 236–241, 1 set. 2015.

PATEL, JayendrakumarB *et al.* Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 447, 2016.

PATIL, Shankargouda *et al.* Proteomic Changes in Oral Keratinocytes Chronically Exposed to Shisha (Water Pipe). **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 23, n. 2, p. 86–97, 1 fev. 2019a.

PATIL, Shankargouda *et al.* **The relationship of "shisha" (water pipe) smoking to the risk of head and neck cancer**. **Journal of Oral Pathology and Medicine**Blackwell Publishing Ltd, , 1 abr. 2019b.

PATIL, Shankargouda *et al.* Multiomic analysis of oral keratinocytes chronically exposed to shisha. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 48, n. 4, p. 284–289, 1 abr. 2019c.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019. *[S.d.]*.

POTEMPA-JEZIOROWSKA, Magdalena *et al.* Saliva and its value as a diagnostic material. **Pediatria i Medycyna Rodzinna**, v. 18, n. 1, p. 34–39, 31 maio 2022.

PRASAD, Gareema; MCCULLOUGH, Michael. Chemokines and cytokines as salivary biomarkers for the early diagnosis of oral Cancer. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging. **Cells**, v. 13, n. 17, p. 1413, 24 ago. 2024a.

PRUD'HOMME, Gérald J.; WANG, Qinghua. **Anti-Inflammatory Role of the Klotho Protein and Relevance to Aging**. **Cells**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2024b.

QASIM, Hanan *et al.* Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 9, 22 set. 2017.

QASIM, Hanan *et al.* **The effects of hookah/waterpipe smoking on general health and the cardiovascular system**. **Environmental Health and Preventive Medicine**BioMed Central Ltd., , 14 set. 2019.

RAJ, Sonali; AHUJA, Mehak. The versatility of klotho protein: insights into its multifaceted functions in health and disease. **World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research**, p. 12–17, 5 jun. 2024.

RAPADO-GONZÁLEZ, Óscar *et al.* **Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 12 set. 2016.

RATHNAYAKE, Nilminie *et al.* Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 7, 20 jan. 2017.

RODRÍGUEZ-RABASSA, Mary *et al.* Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, 7 nov. 2018.

ROITT, I. ;.; BROSTOFF, J. ;.; MALE, D. **Imunologia**. 6a Ed. ed. São Paulo: Manole, 2003.

ROSENBERG, Steven A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5451–5458, 15 jun. 2014.

RUBINSTEIN, Mark L. *et al.* **Adolescent Exposure to Toxic Volatile Organic Chemicals From E-Cigarettes**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/>.

SABI, Salsabeel H. *et al.* Changes at global and site-specific DNA methylation of MLH1 gene promoter induced by waterpipe smoking in blood lymphocytes and oral epithelial cells. **Inhalation Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 124–130, 2020.

SAHEBJAMEE, Mahnaz; ATARBASHI-MOGHADAM, Fazele. **Salivary concentration of TNFα, IL1α, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma Article in Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal** ·. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v13i5/medoralv13i5p292.pdf>.

SAMPAIO, Andréia dos Santos Silva *et al.* Perfil do paciente jovem com câncer de boca: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e29511830934, 19 jun. 2022.

SANCILIO, Silvia *et al.* Cytotoxicity and apoptosis induction by e-cigarette fluids in human

gingival fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 3, p. 477–483, 1 abr. 2016.

SANTOS, Ubiratan Paula. Cigarro eletrônico--repaginação e renovação da indústria do tabagismo. **J Bras Pneumol**, v. 44, n. 5, p. 345–346, 2018.

SARAIVA, Margarida; VIEIRA, Paulo; O'GARRA, Anne. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.

SATO, J.; GOTO, J.; MURATA, T. Changes in saliva interleukin-6 levels in patients with oral squamouscellcarcinoma. **"OralSurg ery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 3, p. 330–336, 2010.

SCHAPHER, Mirco; WENDLER, Olaf; GRÖSCHL, Michael. **Salivary cytokines in cell proliferation and cancer**. **Clinica Chimica Acta**, 18 set. 2011.

SCHERR, Andreas *et al.* Airway reactivity to mannitol is similarly increased in chronic cigarette

and water pipe smokers. **International Journal of COPD**, v. 13, p. 157–163, 2018.

SCHLAUCH, Robert C. *et al.* The moderating effect of family involvement on substance use risk factors in adolescents with severe emotional and behavioral challenges. **Addictive Behaviors**, v. 38, n. 7, p. 2333–2342, jul. 2013.

SEDGER, Lisa M.; MCDERMOTT, Michael F. **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future**. **Cytokine and Growth Factor Reviews**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2014.

SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. **Anatomia & Fisiologia**. 6ª Edição ed. *[S.l.]*: Lusociência, 2003.

SEMLALI, A. *et al.* Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 5, p. 533–541, out. 2011.

SEPULVEDA INOSTROZA, EA *et al.* Evaluation of micronuclei, cytomorphometric and cytologic

changes of the oral mucosa in hookah and cigarette smokers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 137, n. 6, p. 640–650, jun. 2024.

SERAPINAS, Danielius *et al.* **Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status Infiammazione sistemica nella BPCO in rapporto alla condizione tabagica**. *[S.l.: S.n.]*.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018a.

SGAMBATO, Judi Azevedo *et al.* Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to non-tobacco consumers. **Cytokine**, v. 107, p. 43–51, 1 jul. 2018b.

SHAO, Zhe *et al.* Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with the angiogenesis and clinical outcome. **Oral Oncology**, v. 44, n. 12, p. 1110–1117, dez.
2008.

SHARMA, Mohit *et al.* Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 15, n. 5, p. 705–714, out. 2011.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. **Cytokines in anaesthesia Characteristics of cytokines (modified from Molloy, Mannick and Rodrick 86 and Abbas, Lichtman and Pober 1)British Journal of Anaesthesia**. *[S.l.: S.n.]*.

SHETH, Chirag C. *et al.* Modulation of salivary cytokines in response to alcohol, tobacco and caffeine consumption: a pilot study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

SHIELDS, Peter G. *et al.* Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. **EBioMedicine**, v. 60, p. 102982, out. 2020.

SHIHADEH, Alan *et al.* Toxicant content, physical properties and biological activity of waterpipe tobacco smoke and its tobacco-free alternatives. **Tobacco Control**, v. 24, p. i22–i30, 1 mar. 2015.

SHIPLO, Samantha; CZOLI, Christine D.; HAMMOND, David. E-cigarette use in Canada: Prevalence and patterns of use in a regulated market. **BMJ Open**, v. 5, n. 8, 2015.

SIEGEL, Michael B.; TANWAR, Kerry L.; WOOD, Kathleen S. Electronic cigarettes as a smoking-cessation tool: Results from an online survey. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 40, n. 4, p. 472–475, abr. 2011.

SILVA, T. A. *et al.* Increased expression of IL-10 in tumor-associated macrophages is related to advanced clinical stages of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, p. 903–909, 2015.

SIMSEK OZEK, N. *et al.* Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 13, p. 1472–1478, 1 dez. 2016.

SINGH, Prerana; VERMA, Jitendra K.; SINGH, Jayant Kumar. Validation of Salivary Markers, IL1β, IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

SINGH, Prithvi Kumar *et al.* Genetic polymorphism of interleukin-10 (-A592C) among oral cancer with squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 18–22, maio 2017.

SIRAVEGNA, Giulia *et al.* **Integrating liquid biopsies into the management of cancer**. **Nature Reviews Clinical Oncology**Nature Publishing Group, , 1 set. 2017.

SMITH, K. A.; FAVATA, M. F.; OROSZLAN, F. Production and characterization of monoclonal antibodies to human interleukin 2: strategy and tactics. **J Immunol**, 1983.

SOARES, Tatiana de Abreu Braga. **Cigarro e outras formas de tabaco: investigação de conhecimento, atitudes e percepção de risco em estudantes de medicina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental)—*[S.l.]*: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

SONEJI, Samir *et al.* **Association between initial use of e-cigarettes and subsequent cigarette smoking among adolescents and young adults a systematic review and meta-analysis**. **JAMA Pediatrics**American Medical Association, , 1 ago. 2017.

SOUZA, Miriam; SZKLO, Andre; DE ALMEIDA, Liz Maria. Impact of the reduction of smoking prevalence on the trend of lung cancer mortality in Brazil. Tobacco Induced Diseases. **Brazilian National Cancer Institute, Epidemiology Division, Brazil**, v. 16, p. 591, 2018.

ST. HELEN, Gideon *et al.* Nicotine and Carcinogen Exposure after Water Pipe Smoking in Hookah Bars. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, n. 6, p. 1055–1066, 1 jun. 2014.

STATE FACT SHEETS. **Smoking & Tobacco Use** .

STJOHN, M. A.; LI, Y.; ..ZHOU. Interleukin6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of Otolaryngology**, v. 130, n. 8, p. 929–935, 2004.

STRZELAK, Agnieszka *et al.* **Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: A mechanistic review**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**MDPI AG, , 21 maio 2018.

SUGIMOTO, Shinya *et al.* Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associatedwith staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 8, p. 1645–1655, abr. 2013.

SULTAN, Ahmed S.; JESSRI, Maryam; FARAH, Camile S. Electronic nicotine delivery systems: Oral health implications and oral cancer risk. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 50, n. 3, p. 316–322, 1 mar. 2021.

SUN, Zhongwei *et al.* Effect of interleukin-1β and tumor necrosis factor α gene silencing on mouse gastric cancer cell proliferation and migration. **Oncology Letters**, v. 11, n. 4, p. 2559–2565, 1 abr. 2016.

SUNDAR, Isaac K. *et al.* E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77196–77204, 22 nov. 2016.

SWENSON, Wade G.; WUERTZ, Beverly R. K.; ONDREY, Frank G. Tobacco carcinogen mediated

up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 50, n. 9, p. 668–679, set. 2011.

szklo2011. *[S.d.]*.

TAATI, Behzad; ARAZI, Hamid; SUZUKI, Katsuhiko. **Oxidative stress and inflammation induced by waterpipe tobacco smoking despite possible protective effects of exercise training: A review of the literature**. **Antioxidants**MDPI, , 1 set. 2020.

TABRIZI, Reza *et al.* Hookah Smoking: A Potentially Risk Factor for First-Ever Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 10, 1 out. 2020.

TANG, Anqi *et al.* **Klotho's impact on diabetic nephropathy and its emerging connection to diabetic retinopathy**. **Frontiers in Endocrinology**Frontiers Media S.A., , 2023.

TANG, X. *et al.* Expression of klotho and β-catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. **Diseases of the Esophagus**, v. 29, n. 3, p. 207– 214, 1 abr. 2016.

TANIGUCHI, T.; HIROSHI, M.; TAKASHI, F. Structure and expression of a cloned cDNA for uman

inlerleukin-2. **nature**, 1983.

TAYLOR, John J.; PRESHAW, Philip M. **Gingival crevicular fluid and saliva**. *[S.l.: S.n.]*.

THOMSON, P. **Lesões pré-malignas da boca: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: *[S.n.]*.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. A brief outline of the immune system. **Methods in Molecular Biology**, v. 1184, p. 3–12, 2014.

TORREY, Christine M. *et al.* Waterpipe cafes in Baltimore, Maryland: Carbon monoxide, particulate matter, and nicotine exposure. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 25, n. 4, p. 405–410, 19 jul. 2015.

TSAI, C. C. *et al.* Interleukin-1 beta in oral submucous fibrosis, verrucous hyperplasia and squamous cell carcinoma tissues. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 15, n. 9, p. 513–9, set.

1999.

UCHIDA, Hitoshi; OVITT, Catherine E. Novel impacts of saliva with regard to oral health. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 127, n. 3, p. 383–391, mar. 2022.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and

diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. **Journal of Cytology**, v. 33, n. 3, p. 125–129, 1 jul. 2016.

UDAYASHANKAR, Urmila *et al.* Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and

diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. v. 33, n. 3, p. 125–129, 2021.

URRUTIA-PEREIRA, M. *et al.* Youth tobacco use in Latin America: What is the real extent of the problem? **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 4, p. 328–335, 2019.

VAN HORSSEN, Remco; TEN HAGEN, Timo L. M.; EGGERMONT, Alexander M. M. **TNF-α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility Learning ObjectivesThe Oncologist**. *[S.l.: S.n.]*. Disponível em: <www.TheOncologist.com>.

VARGAS, Luana Soares *et al.* Riscos do uso alternativo do cigarro eletrônico: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 30, p. e8135, 20 jul. 2021.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p. 53–57, 1 fev. 2017a.

VERDE, Zoraida *et al.* A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. **Lung**, v. 195, n. 1, p. 53–57, 1 fev. 2017b.

VEZINA, P.; MCGEHEE, D. S.; GREEN, W. N. **Exposure to nicotine and sensitization of nicotine-**

induced behaviors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 15 nov. 2007.

VIEIRA, Ângela Chaves; AGUIAR, Zildeny da Silva Teixeira; SOUZA, Francielli Vieira. Tabagismo

e sua relação com o câncer bucal: uma revisão de literatura. **Revista Bionorte**, v. 4, n. 2, p. 9–18, 2015.

WANG, Qihui *et al.* Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 427, p. 79–85, 1 jan. 2014.

WANG, Y. F.; CHANG, S. Y.; TAI, S. K. “Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 recep tor expressions in oral squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 24, n. 9, p. 850–858, 2002.

WARD, Kenneth D. **The waterpipe: An emerging global epidemic in need of action**. **Tobacco Control**BMJ Publishing Group, , 1 mar. 2015.

WARREN, Graham; SINGH, Anurag. Nicotine and lung cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v. 12, 1 jan. 2013.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **United Nations high-level meeting on noncommunicable disease prevention and control.**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2014**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/ bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on the global tobacco epidemic, 2017:**
monitoring tobacco use and prevention policies.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tobacco. n. May 2020, p. 1–8, 2021.

WILKINSON, Emma. Earlier cancer diagnosis would reduce NHS costs. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 12, p. e529, 2014.

WILLERSHAUSEN, Ines *et al.* Influence of E-smoking liquids on human periodontal ligament fibroblasts. **Head and Face Medicine**, v. 10, n. 1, 15 set. 2014.

WISNIEWSKI, Brett T. *et al.* Toxicity and infectivity: insights from de novo prion formation. **Current Genetics**, v. 64, n. 1, p. 117–123, 30 fev. 2018.

WISNIEWSKI, David J.; MA, Tao; SCHNEIDER, Abraham. Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. **Experimental Cell Research**, v. 370, n. 2, p. 343–352, 15 set. 2018.

WOLF, I. *et al.* Klotho: A tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 56, p. 7094–7105, 27 nov. 2008.

WOODS, K. V. *et al.* Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens . **Cancer Research**, v. 58, n. 14, p. 3132–3141, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. *[S.l.: S.n.]*.

XIE, Biao *et al.* **Klotho acts as a tumor suppressor in cancers**. **Pathology and Oncology Research**, out. 2013.

YAMAZAKI, Yuji *et al.* Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, n. 3, p. 513–518, jul. 2010.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings
from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022a.

YAO, Yu *et al.* Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings
from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. **Tobacco Induced Diseases**, v. 20, n. 6, 1 jun. 2022b.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. 2020.

YE, Dongxia *et al.* Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping. *[S.d.]*.

YOON, Angela J. *et al.* Inflammatory biomarkers in saliva: Assessing the strength of

association of diabetes mellitus and periodontal status with the oral inflammatory burden. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 5, p. 434–440, maio 2012.

YORK, Autumn G. *et al.* IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. **Nature**, v. 627, n. 8004, p. 628–635, 21 mar. 2024.

ZHANG, Aihua; SUN, Hui; WANG, Xijun. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 6, p. 1718–1727, nov. 2012.

ZHOU, Juan *et al.* Serum β-klotho is a potential biomarker in the prediction of clinical outcomes among patients with NSCLC. **Journal of Thoracic Disease**, v. 13, n. 5, p. 3137–3150, 1 maio 2021a.

ZHOU, Yan *et al.* The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, 24 ago. 2021b.

Figures and Tables

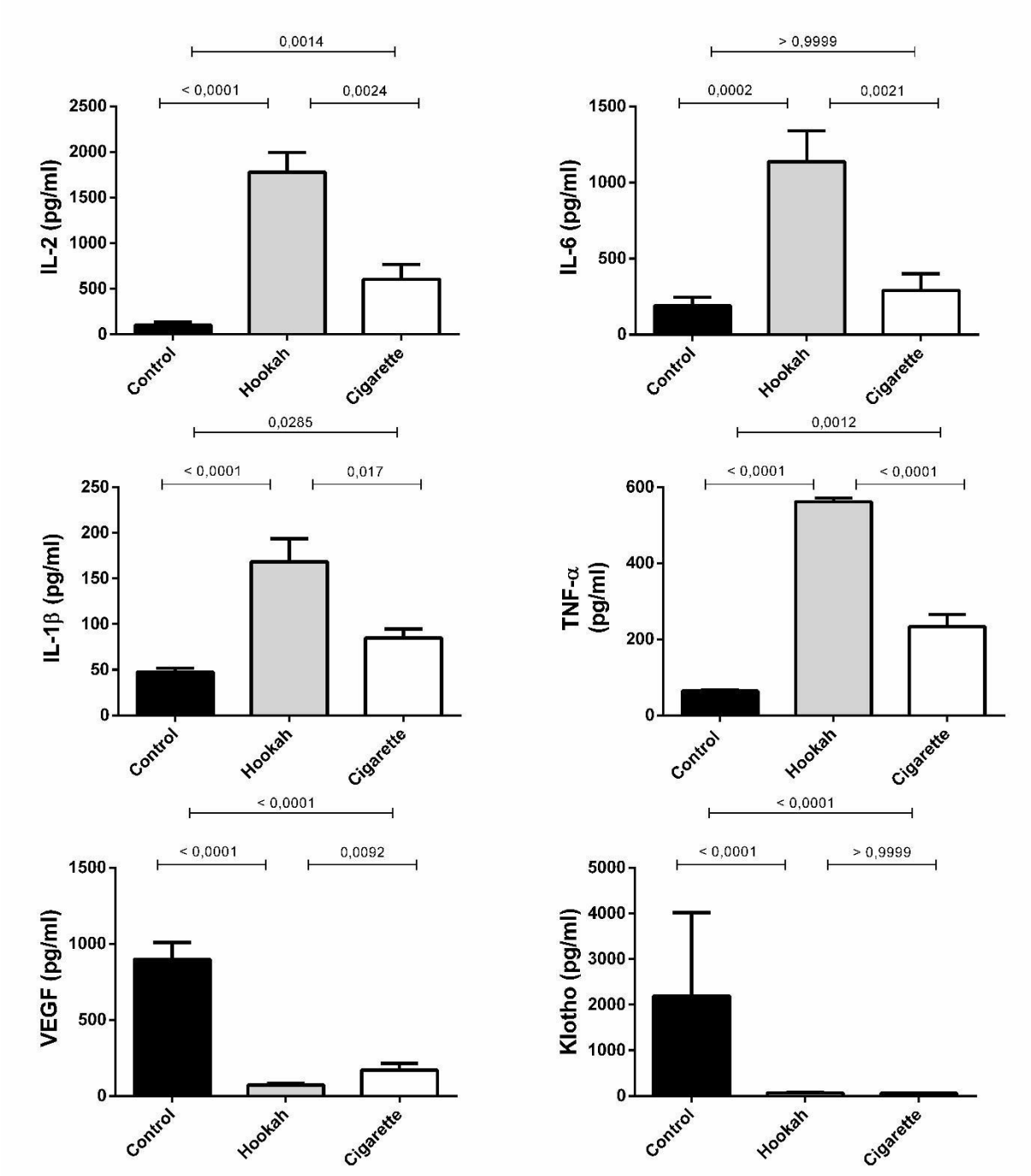


Figure 1. Distribution of expression of the salivary inflammatory mediators and Klotho protein studied in each group and statistical significance of the comparisons.

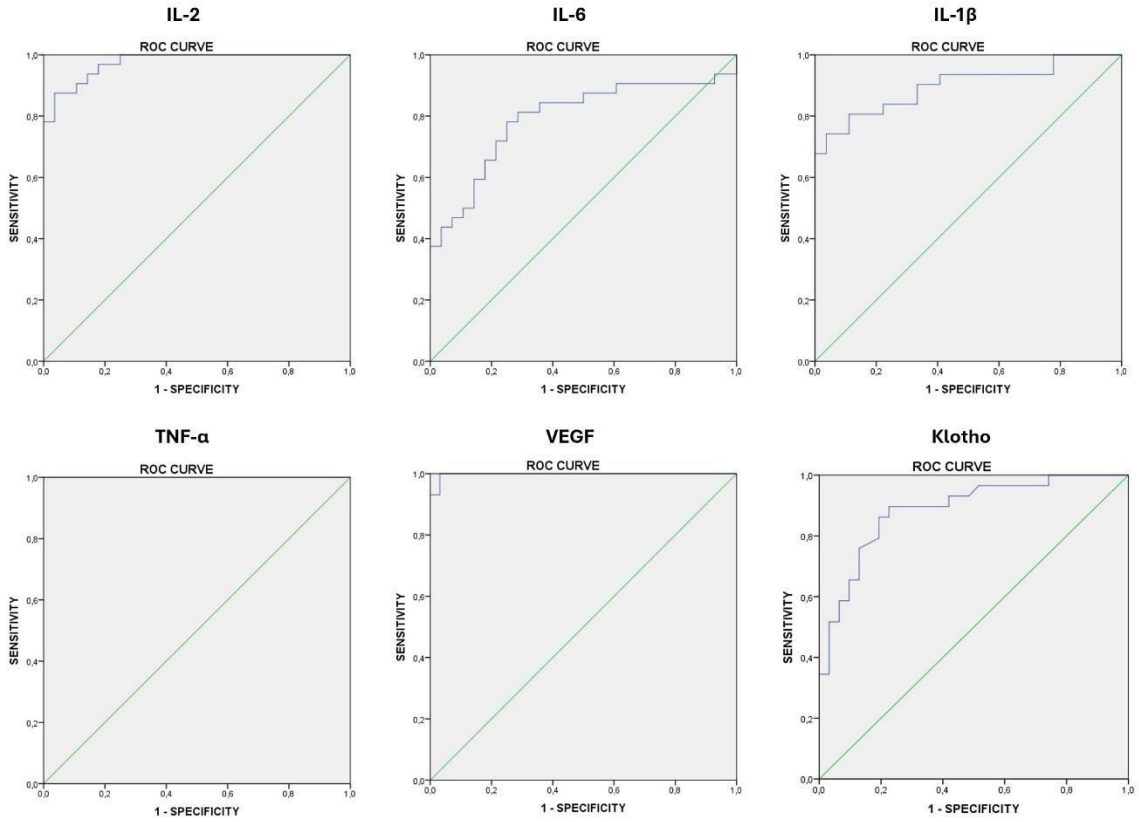


Figure 2. The ROC curve analysis for distinguishing the Hookah group from the Control group using salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. For IL-2: Sensitivity of 87,5%, specificity of 83.27% (AUC=0.975 (CI95% 0.946-1); p<0.001). For IL-6: Sensitivity of 78,1%, specificity of 75% (AUC=0.792 (CI95% 0.674-0.910); P<0.001). For IL1-β: Sensitivity of 74,2%, specificity of 96,3% (AUC=:0.898 (CI95% 0.817-0.980); P<0,001). For TNF-α: Sensitivity of 100%, specificity of 100% (AUC=1 (CI95% 1-1); P<0,001). The ROC curve analysis for distinguishing the control group from the hookah group using salivary inflammatory mediators and Klotho protein expression data. For VEGF: Sensitivity of 100%, specificity of 96,9% (AUC=0.998 (CI95% 0,992-1); P<0,001). For Klotho: Sensitivity of 89,7%, specificity of 77,4% (AUC=0.886 (CI95% 0.802-0.970); P<0,001).

		Hookah Group n=33	Cigarette Group n=22	Control Group n=30
Age (years)	Average	21,18	29	25,6
	Standard Deviation	2,7 18-	5,56	7,16
	Range	31	20-38	18-43
Sex	Male	9	9	7
	Female	24	13	23
Tobacco consumption	Average*	5,68	14,59	NA
	Standard Deviation*	5,27	4,99	NA

Tobacco consumption period (years)	**Average***	4	12,00	NA
	Standard Deviation*	1,73	4,74	NA
Alcohol-related risk score	**low-risk drinking at-**	20	16	28
	risk drinking	9	5	2
	hazardous drinking probable	2	1	0
	dependence	2	0	0

NA: Not applicable

*Tobacco consumption for the Hookah Group = number of sessions per week and for the Cigarette Group = number of cigarettes per day

Table 1. Distribution of the sample according to age, sex, tobacco consumption, smoking duration, and alcohol-related risk score (Sepulveda Inostroza et al., 2024).

Protein level (ng/mL)		**Hookah Group**	**Cigarette Group**	**Control Group**
IL 2	Mean	101,5420357	1777,973938	605,4717962
	Standard Deviation	169,7769145	1214,717033	816,5081548
IL6	Mean	189,4532143	1136,528531	290,8647912
	Standard Deviation	298,1404153	1150,359675	560,5021806
IL1 beta	Mean	47,37962963	168,161129	84,772915
	Standard Deviation	23,27812375	141,5317011	49,37902279
TNF alfa	Mean	64,44339286	561,9633438	233,6209028
	Standard Deviation	14,08953998	53,1827627	158,8487157
VeGf	Mean	916,2228929	73,946125	176,1848108
	Standard Deviation	593,0969441	55,26158243	225,0274573
Kloto	Mean	2191,009	69,11832258	58,5945092
	Standard Deviation	9827,052772	56,74675995	58,74108299

Table 2. Protein expression level in the studied groups (ng/mL).

			Age	**Alcohol use**	**Alcohol (dose/day)**	**Alcohol-related risk score**	**Number of sessions per week**	**Tobacco consumption period (years)**
Hookah group	***IL 2***	Spearman's correlation coefficients p-value	-0,09270551 0,6389275	0 1	-0,1533064 0,4360642	0,2038047 0,2982315	0,2342531 0,2302094	0,1384425 0,4823276
	IL6	Spearman's correlation coefficients p-value	0,08002464 0,6856284	-0,3691526 0,053209	0,0205683 0,9172599	0,088557 0,6540685	-0,1882649 0,3373567	0,07856363 0,6910863
	IL1 beta	Spearman's correlation coefficients p-value	-0,02953037 0,881421	0,2746806 0,15719	-0,07305782 0,7117888	0,2376803 0,2232651	0,2035771 0,2987829	-0,0133707 0,9461612
	TNF alfa	Spearman's correlation coefficients p-value	0,1597515 0,4167803	-0,2746806 0,15719	0,05493718 0,7812763	0,3442647 0,07282687	-0,2311855 0,2365462	-0,01448493 0,9416819
	VeGf	Spearman's correlation coefficients p-value	-0,1233314 0,5318076	-0,06867016 0,7284322	-0,1018207 0,6061592	-0,1148467 0,56061	0,1065294 0,5895146	0,007799577 0,9685792
	Kloto	Spearman's correlation coefficients p-value	**-0,465183** **0,01261828**	-0,2060669 0,2927842	0,2182265 0,2645887	0,2878841 0,1373998	0,0377976 0,8485606	-0,2197018 0,261292

Cigarette group	*IL 2*	Spearman's correlation coefficients p-value	0,2998378 0,1866613	0,3692745 0,09946836	-0,3534203 0,1160392	-0,3354137 0,1482605	0,3990664 0,07312074	0,3415428 0,1296966
	IL6	Spearman's correlation coefficients p-value	0,111012 0,6919996	-0,1744658 0,1040293	0,04225771 0,8810372	0,2393655 0,4064025	-0,3289531 0,1739375	0,100722 0,7222973
	IL1 beta	Spearman's correlation coefficients p-value	0,2705695 0,2355163	0,1477098 0,5228469	0,05743925 0,8046716	-0,02521333 0,9159685	0,3215451 0,1552144	0,2995875 0,1870474
	TNF alfa	Spearman's correlation coefficients p-value	-0,280976 0,2172803	0,01846372 0,9366852	0,006757559 0,976808	-0,15128 0,5243443	0,02359346 0,919144	-0,3271206 0,1477739
	VeGf	Spearman's correlation coefficients p-value	0,01495937 0,9486852	0,2584921 0,2578921	-0,2642206 0,2471161	-0,2055268 0,3846856	-0,02966035 0,8984454	0,1514326 0,5123042
	Kloto	Spearman's correlation coefficients p-value	**-0,4552852** **0,03808565**	-0,4246656 0,05500215	0,3973445 0,07448314	0,4133458 0,07006087	-0,0532538 0,8186681	-0,2392766 0,2961925

Table 3. Spearman correlation of expression of the salivary inflammatory mediators and Klotho protein with clinical findings in the hookah and cigarette groups.

APÊNDICE 2 – Versão em inglês do artigo 3 nas normas do periódico "ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY AND ORAL RADIOLOGY" (ISSN: 2212-4403).

Inflammatory mediators and Klotho protein in saliva of e-cigarette users

Fernanda Rodrigues dos Santos[1], Bruna Fernandes do Carmo Carvalho[2], Natália de Carvalho Faria[2], Maysa Alves Rodrigues Brandão Rangel[3], Janete Dias Almeida[2], Andre Luis Lacerda Bachi[4], Rodolfo de Paula Vieira[5,6], Mônica Ghislaine Oliveira Alves[2]*

[1]Technology Research Center (NPT), Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil. [2]Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos Campus, São Paulo, Brazil.

[3]School of Medicine, Anhembi Morumbi University, Sao José dos Campos, Brazil [4]University of Santo Amaro (UNISA), São Paulo, Brazil.
[5]Evangelical University of Goiás (Unievangélica), Anápolis, Brazil.
[6]Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), Sao José dos Campos, Brazil.

*Correspondence may also be addressed to: Mônica Ghislaine Oliveira Alves
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Câmpus de São José dos Campos, São Paulo, Brazil.
777 Eng. Francisco José Longo Avenue. São José dos Campos, São Paulo, Brazil
Zip code: 12245-000
Phone number: + 55 1239479411/ + 55 12981278200
E-mail: monica.alves@unesp.br

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the expression of inflammatory mediators and Klotho protein in the saliva of electronic cigarette (e-cig) users, and to correlate this expression with clinical, salivary, and device consumption data. The e-cig group consisted of 25 individuals who were regular and exclusive users of e-cigs for at least 6 months, and the control group consisted of 25 individuals who did not smoke and did not use e-cigs. There were no visible clinical alterations in the oral mucosa in either group. Clinical data and specific information on alcohol and tobacco consumption habits were obtained from the participants. The levels of proinflammatory cytokines (IL-2, IL-6, TNF-α), anti-inflammatory cytokines (IL-10), growth factors (TGF-ß, VEGF), and Klotho protein were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using BioLegend's Human ELISA Max™ Deluxe kit. Data were subjected to the Mann-Whitney test and Spearman correlation, with significance set at $p \leq 0.05$. A statistically significant difference was observed in all mediators studied, with e-cig users exhibiting increased expression of IL-2 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), TNF-α ($p = 0.02$), and VEGF ($p < 0.0001$) and reduced expression of IL-10 ($p < 0.0001$) and Klotho ($p = 0.01$). There was a significant positive correlation between the duration of e-cig consumption (years) and IL-6 expression (Spearman correlation coefficient = 0.42; $p = 0.03$), between simultaneous e-cig and alcohol use and TNF-α expression (Spearman correlation coefficient = 0.47; $p = 0.02$), and between the duration of each session (minutes) and IL-10 expression (Spearman correlation coefficient = 0.43; $p = 0.02$). The increased expression of inflammatory mediators (IL-2, IL-6, TNF-α, VEGF) and reduced expression of IL-10 in the e-cig group indicate a salivary environment with proinflammatory characteristics. Additionally, the

reduced expression of Klotho protein suggests potential premature aging of cells. These changes might be associated with chronic inflammation, early cellular aging, and an increased risk of periodontal and malignant diseases.

Keywords: Saliva, Cytokines, Klotho Proteins, Electronic Nicotine-Delivery Systems, Electronic Cigarette, E-Cig, Smoking

INTRODUCTION

Electronic nicotine-delivery systems or electronic cigarettes (e-cigs) were first commercialized by the Imperial Tobacco Group after they had acquired the patent for the model developed by the Chinese pharmacists Hon Lik. The initial aim was to replace conventional cigarettes in an attempt to reduce health damage and as an auxiliary method to quit smoking (Bertoni & Szklo, 2021; Katarina Gustafsson, 2013; State Fact Sheets, 2022). However, these devices may be used for years and are not potentially helpful in the efforts to quit smoking (Behar et al., 2015; Ganapathy et al., 2017).

E-cigs are composed of a battery, an atomizer, and a cartridge filled with a flavored fluid that generally contains nicotine. When the device is activated, the battery heats the liquid to an estimated temperature of 350ºC, which is then transformed into vapor that is inhaled by the user. The high temperature during inhalation can induce chemical and physical changes in the compounds of the liquids, increasing their toxicity (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2019; Kosmider et al., 2014). The continuous use of e-cigs has been associated with various symptoms such as dyspnea, cough, headache, dizziness, and infections in the mouth and oropharynx (Barufaldi et al., 2021; Cao et al., 2020; Da Silva & Moreira, 2019).

In Brazil, the advertising, marketing, and use of e-cigs have been prohibited since 2009 through Decree RDC 46 08/28/2009 of the National Health Surveillance Agency, ratified in 2024. However, illegal trade persists, driven by a high level of consumption, which has a direct impact on public health policies (Barufaldi et al., 2021; Cao et al., 2020; Da Silva & Moreira, 2019).

It is noteworthy that tobacco use among adults has seen a considerable decline worldwide; however, nicotine addiction among adolescents and young adults has become a growing global problem. In Brazil, the 2009 Global Youth Tobacco Survey (GYTS) revealed that the use of tobacco products is common among students aged 13 to 15 years (Cavalcante et al., 2017; Glasser et al., 2018; OliveiraCampos et al., 2018; Soneji et al., 2017; Bertoni & Szklo, 2021; Ma et al., 2021; Malta et al., 2018; Ng et al., 2014; Szklo,2011). According to the WHO, the use of e-cigs is much higher among children aged 13 to 15 years than among adults and has been growing at an alarming rate worldwide (PAHO/OPAS, 2023).

Salivary evaluation is a noninvasive diagnostic tool that can be used for the detection of cells and markers. This method is fast, simple, inexpensive, and well accepted by patients. Saliva is a fluid

present in the oral cavity that is composed of water and organic and inorganic compounds such as proteins, enzymes, and electrolytes. Its composition can be altered by hormonal changes, medications, and habits such as smoking and excessive alcohol consumption (Jia et al., 2017; Kaluarachchi et al., 2016; Navale et al., 2023; Rapado-González et al., 2016; Siravegna et al., 2017).

The aim of the present study was to evaluate the expression of inflammatory mediators and Klotho protein in the saliva of e-cig users, and to correlate this expression with clinical, salivary, and device consumption data.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Humans of the Institute of Science and Technology, Paulista State University (ICT-UNESP) (CAAE: 36911420.0.0000.0077, Opinion number: 4.397.780). All participants signed the informed consent form and were submitted to extra- and intraoral clinical examination.

The sample size was defined based on the statistical parameters proposed by Ye et al. (2020). The e-cig group consisted of 25 adult individuals who had regularly and exclusively used e-cigs for at least 6 months and who did not show visible clinical alterations in the oral mucosa. The control group consisted of 25 non-smokers and non-e-cig users without visible clinical alterations in the mucosa, who were matched for sex and age to the e-cig group. Patients with autoimmune diseases and a history of surgical cancer treatment, radiotherapy and/or chemotherapy in any organ or system were not included in the sample. Dual smokers (simultaneous users of conventional cigarettes and e-cigs) and patients previously treated for autoimmune diseases were also not included.

The participants in the present study were part of the same cohort studied by Carvalho et al. (2024). Thus, epidemiological (age, sex, self-declared race/skin color, education) and physical characteristics (heart rate, capillary blood glucose, oximetry, carbon monoxide concentration), salivary variables (sialometry, pH, viscosity, cotinine concentration), alcohol consumption data (AUDIT score, types and quantity of beverages), and e-cig use data (duration and frequency of use, vaporized volume, nicotine concentration, concomitant alcohol use) have been described in detail in a previous publication from our group (Carvalho et al., 2024).

For saliva sampling, patients were instructed not to brush their teeth or eat any food 2 hours before collection. Patients should also not have consumed alcohol for 12 hours. To reduce contamination with oral debris, 10 minutes before collection, patients rinsed their mouths with distilled water for 1 minute (Oliveira Alves et al., 2020). Unstimulated saliva was collected in a calm environment without interruptions over a period of 5 minutes. The salivary flow rate (mL/min) was calculated as the ratio of the volume of saliva obtained in mL, divided by 5 minutes (Navazesh & Kumar, 2008). The saliva samples were stored immediately in a freezer at -80ºC.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using the Human ELISA Max™ Deluxe kit

(BioLegend, Inc., San Diego, USA) were performed to analyze the levels of proinflammatory cytokines (interleukin 2 [IL-2], IL-6, tumor necrosis factor [TNF]-α), anti-inflammatory cytokines (IL-10), growth factors (transforming growth factor [TGF]-ß, vascular endothelial growth factor [VEGF]), and Klotho protein according to the manufacturer's instructions. For each mediator, 100 µL of whole saliva from each patient was used (Brandao-Rangel et al., 2024). Readings were performed on the SpectraMax i3 Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices, San Jose, USA).

The GraphPad Prism 5.0 software was used for statistical analysis. The data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and compared using the Mann-Whitney test, considering a p-value $\leq$ 0.05 to be significant. Spearman's correlation analysis was applied to examine the association between expression of the mediators and clinical data.

RESULTS

Fifty saliva samples were analyzed, including 25 from regular and exclusive e-cig users and 25 from non-smokers (control group).

Figure 1 shows the distribution of cytokine expression in each group and the statistical significance of the comparisons. A statistically significant difference was observed in all mediators studied. There was an increase in the expression of IL-2 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), TNF-α ($p = 0.02$), and VEGF ($p < 0.0001$) and a reduction in the expression of Klotho protein ($p = 0.01$) and IL-10 ($p < 0.0001$) in e-cig users.

Table 1 shows the Spearman correlations between expression of the cytokines studied and clinical findings in the e-cig group. A significant positive correlation was observed between the duration of e-cig use (years) and IL-6 expression (Spearman correlation coefficient = 0.42; $p = 0.03$), between simultaneous e-cig and alcohol use and TNF-α expression (Spearman correlation coefficient = 0.47; $p = 0.02$), and between the duration of each session (minutes) and IL-10 expression (Spearman correlation coefficient = 0.43; $p = 0.02$).

DISCUSSION

The effects of smoking on salivary composition have been widely described in the literature, including in individuals who had quit the habit. Exposure of the oral mucosa to tobacco smoke can cause significant cellular alterations that are potentially associated with the development of neoplasms such as oral and oropharyngeal cancer (Da Silva & Moreira, 2019; Semlali et al., 2011; Simsek Ozek et al., 2016; Sugimoto et al., 2013), as well as with changes in the salivary metabolome (Greenfield et al., 2023).

The present study analyzed the levels of inflammatory cytokines and Klotho protein in the saliva of e-cig users. Although the sample size can be considered a limitation of the study, the expression of

proinflammatory mediators was significantly increased in the e-cig group. These results are consistent with the findings of a previous study conducted by our group, which demonstrated changes in metabolites associated with inflammatory processes (Carvalho et al., 2024). Additionally, Carvalho et al., 2024 reinforced the potential damage e-cigs can cause to oral and systemic health, suggesting the need for clinical monitoring and preventive strategies to minimize their impacts. We found no studies evaluating Klotho protein in the saliva of e-cigarette users.

Chronic inflammation caused by chemical agents is related to carcinogenesis. Substances such as cytokines, free radicals, prostaglandins, and growth factors act on chronically inflamed tissues, thereby inducing genetic and epigenetic alterations in pathways responsible for maintaining homeostasis, for example point mutations in tumor suppressor genes, DNA methylation, and posttranslational modifications (Hussain & Harris, 2007).

Vaping poses health risks, including endothelial dysfunction often associated with cardiovascular diseases. These effects are the result of exposure to agents present in the solvents of ecig vapor such as acrolein, formaldehyde, and acetaldehyde, which can induce apoptosis of endothelial cells, in addition to causing oxidative stress and inflammation (Buchanan et al., 2020; Qasim et al., 2017). Acrolein can also interfere with the oxidation of regulatory proteins and oxidative processes in endothelial cells, which can lead to cell dysfunction and death (Szadkowski & Myers, 2008). Formaldehyde is classified as a carcinogen and can cause alterations in the cardiovascular system (Buchanan et al., 2020; Cichońska et al., 2019; Lee et al., 2019; Lisa Cheng et al., 2014). Additionally, the presence of flavorings has been reported to decrease the antimicrobial activity of the user's saliva through the inhibition of lysozyme and immunoglobulin A (Cichońska et al., 2019; Lee et al., 2019).

The flavorings used in e-cigs, also called e-liquids, are characterized by a high level of cytotoxicity. These liquids are based on propylene glycol and vegetable glycerin, which are cytotoxic compounds (Beklen & Uckan, 2021) and have been associated with an increase in oxidative stress (Ji et al., 2019) and with the release of proinflammatory mediators such as prostaglandin E2 and cyclooxygenase 2 (Sundar et al., 2016). Ye et al. (2020) found elevated levels of oxidative stress and apoptosis in periodontal fibroblasts exposed to these substances. Furthermore, the nicotine present in large quantities in these liquids can influence carcinogenesis (Sugimoto et al., 2013; Jităreanu et al., 2021). This compound is associated with the activation of epidermal growth factor receptors and an increase in the migration of dysplastic oral keratinocytes (Wisniewski et al., 2018).

Additionally, it is important to note that chronic smoking is associated with a state of systemic inflammation (Invernizzi, 2011; Serapinas et al., 2010). This dysregulation of the inflammatory balance can contribute to the development of periodontal diseases and increase the risk of progression to malignant conditions (S. H. Lee & Choi, 2013; Mihaila & Todor, 2024).

Cytokines are soluble low molecular weight polypeptides that play an important role in the regulation of inflammatory and immune responses. These molecules can induce responses at the genomic level and are deregulated in inflammatory and carcinogenic processes (Babiuch et al., 2020;

Deepthi et al., 2019). Proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, INF-γ, and TNF-α) are involved in cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition, favoring the growth of immune and tumor cells and increasing immune surveillance. Elevated levels of these cytokines are found in the saliva of patients with oral cancer when compared to healthy patients. On the other hand, anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, and VEGF) are capable of neutralizing the proliferation potential of proinflammatory cytokines (Aziz et al., 2015; Dikova et al., 2021; Ferrari et al., 2021).

In the present study, we observed higher salivary levels of IL-2, IL-6, TNF-α, and VEGF in ecig users compared to the control group. Studies have shown elevated levels of IL-6 and TNF-α in smokers of different modalities such as conventional cigarettes and e-cigs (Faridoun et al., 2021; Ganesan et al., 2020; Miluna et al., 2022; Mokeem et al., 2018). Our results are consistent with the findings of Binshabaib et al. (2018), who identified higher levels of IL-6 and TNF-α in gingival crevicular fluid samples of e-cig users. Additionally, TNF-α has been shown to remain elevated in former smokers, indicating chronic inflammation (Serapinas et al., 2010). Elevated levels of these inflammatory mediators have also been detected in saliva of patients with potentially malignant lesions, oral cancer (Babiuch et al., 2020; Lee et al., 2019; Lisa Cheng et al., 2014), and head and neck lymph node metastases (Dikova et al., 2021).

The positive correlation between higher salivary levels of IL-6 and longer periods of e-cig consumption may be explained by the inflammatory response triggered by e-cigs containing nicotine. In an exploratory review, Boss et al. (2024) observed that the prolonged use of nicotine-containing ecigs resulted in elevated levels of IL-6 in 60% of cases. The authors suggested that prolonged exposure to inflammatory stimuli from the devices may lead to sustained increases in this cytokine. Likewise, Singh et al. (2019) concluded that the increase in the plasma levels of IL-6 and other cytokines was related to the systemic inflammatory response triggered by the constituents of e-cig vapor. The authors emphasized that, despite the correlation between IL-6 levels and the use of e-cigs, individual variability in the response to exposure must be considered, as well as variations related to the frequency of use and brand.

TNF-α is a proinflammatory mediator present in oral cancer that is associated with cell invasion, inflammatory activation, and progression of squamous cell carcinoma (Glogauer et al., 2015; Goertzen et al., 2018). An increase in this cytokine has been linked to increased cell proliferation, while its absence may indicate the inhibition of proliferation and migration (Ho et al., 2012; Sun et al., 2016). Furthermore, TNF-α is considered an important biomarker for the early diagnosis and monitoring of oral cancer (Brailo et al., 2012; Juretić et al., 2013).

In the present study, we found a positive correlation between elevated salivary levels of TNF-α and the concomitant use of e-cigs and alcohol. This association may be attributed to the fact that both substances are related to the induction of inflammatory responses in the body since alcohol consumption is associated with increased systemic inflammation (González-Reimers, 2014). Thus, the simultaneous use of these substances can intensify the inflammatory response. Furthermore, individuals who use ecigs

tend to have risky alcohol consumption patterns (Parikh & Bhattacharyya, 2018; Roberts et al., 2020), especially young adults (Sokolovsky et al., 2023).

According to Lin et al. (2016), VEGF is associated with endothelial cell proliferation, survival, invasion, migration, chemotaxis of bone marrow-derived progenitor cells, vasodilation, and vascular permeability. The authors highlighted the involvement of the VEGF signaling axis in oral cancer. Sgambato et al. (2018) studied plasma samples from smokers and observed elevated levels of VEGF. Serum VEGF levels have been related to the tumor response, with this cytokine being indicated as a potentially useful prognostic marker in the treatment of head and neck cancer (Argiris et al., 2011). Studies highlighted the association of VEGF with the progression and prognosis of oral carcinomas, with the observation of higher levels in advanced tumors (Chuang et al., 2006; Kyzas et al., 2005; Lisa Cheng et al., 2014; Patel et al., 2016). Additionally, tobacco carcinogens enhance the activity of Fos/Jun Activator Protein 1 which, in turn, leads to an increase in the expression of VEGF, supporting an angiogenic phenotype that may facilitate the progression of head and neck cancer (Swenson et al., 2011).

Reduced activity of IL-10 can cause an increased inflammatory response since this antiinflammatory cytokine modulates immune responses (Laffer et al., 2019). Furthermore, IL-10 deficiency is linked to increased expression of inflammatory genes as a result of metabolic dysregulation (York et al., 2024). In the present study, salivary IL-10 levels were reduced in e-cig users. These results agree with Jacobs et al. (2022) and Rodríguez-Rabassa et al. (2018), who found IL-10 to be downregulated in smokers compared to samples from non-smokers. On the other hand, Aziz et al. (2015), analyzing cytokines in unstimulated whole saliva from patients with squamous cell carcinoma, observed elevated IL-10 levels when compared to the control group.

Singh et al. (2017) detected a polymorphism in the promoter region of the IL-10 genes that is significantly associated with a reduced risk of oral squamous cell carcinoma. The authors highlighted the important role of cytokines in the pathophysiology of cancer, which can inhibit tumor development and progression if they are released in response to inflammation. Furthermore, Shields et al. (2020) found a significant link between lipid-laden macrophages and increased IL-10 cytokine levels in e-cig users. According to the authors, as an immune suppressor, this cytokine is involved in combating inflammation, balancing tissue homeostasis. Its levels might be increased to compensate for imbalances caused by exposure to agents present in e-cigs.

Despite the reduction in IL-10 levels in the saliva of e-cig users, there was a positive correlation between higher salivary IL-10 levels and the duration of e-cig use sessions. This finding might be attributed to the anti-inflammatory response induced by high daily exposure to e-cig vapor. Scieszka et al. (2023) highlighted that immune dysregulation associated with exposure to irritants present in e-cig aerosols causes changes in cytokine profiles.

In the present study, salivary levels of Klotho protein were lower in e-cig users. The *Klotho* gene encodes a membrane-bound protein that has been recognized as a key regulator of oxidative stress and cellular senescence, especially in lung tissue (Blake et al., 2015). Reduced levels of Klotho have been

associated with premature aging and different chronic diseases, including cardiovascular and kidney diseases (Castelblanco et al., 2022; Donate-Correa, 2015; Fountoulakis et al., 2018).

E-cig vapor activates NADPH oxidase, an event that increases the production of reactive oxygen species, while aldehydes contribute to oxidative stress and cell death (Kuntic et al., 2023). We therefore suggest that the reduction in the levels of Klotho protein identified in the group of e-cigarette users may reflect a process of cellular damage and premature aging, possibly resulting from oxidative stress induced by e-cig use.

Although there are still no specific studies on the impact of e-cigs on Klotho levels, the literature shows that exposure to conventional cigarette smoke induces oxidative stress and can trigger cellular senescence in the lungs (Blake et al., 2015). A reduction in serum α-Klotho levels may be associated with a compensatory response to stress caused by smoking (Yao et al., 2022; Verde et al., 2017). Verde et al. (2017) suggested smoking-related aging to be linked to a reduction in Klotho levels. Yao et al. (2022) reported that high levels of cotinine, a metabolite of nicotine, are associated with increased Klotho expression, while lower levels correlate with a reduction in the expression of this protein. Furthermore, Kamizono et al. (2018) indicated high Klotho levels to be related to an adaptive response to the stress caused by smoking.

The present study has some limitations, including the relatively small sample size and its crosssectional design that does not permit to establish causality. Future studies should focus on evaluating the long-term effects of e-cig use on oral and general health.

CONCLUSION

The increased expression of the inflammatory mediators IL-2, IL-6, TNF-α, and VEGF and the reduced expression of IL-10 in the e-cig group demonstrate a salivary environment with proinflammatory characteristics. Additionally, the reduced expression of Klotho protein suggests the potential premature aging of cells. A positive correlation was observed between the duration of e-cig consumption in years and IL-6 expression, between simultaneous e-cig and alcohol use and TNF-α expression, and between the duration of each session in minutes and IL-10 expression. These alterations may be associated with chronic inflammation, early cellular aging, and a higher risk of periodontal and malignant diseases.

DECLARATIONS OF INTEREST: None

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; grants #2020/10362-0, #2020/10322-9, #2018/23248-1, and #2012/15165-2) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

REFERENCES

Argiris, A., Lee, S. C., Feinstein, T., Thomas, S., Branstetter IV, B. F., Seethala, R., Wang, L., Gooding, W., Grandis, J. R., & Ferris, R. L. (2011). Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. *Oral Oncology*, *47*(10), 961–966. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.034

Aziz, S., Ahmed, S. S., Ali, A., Khan, F. A., Zulfiqar, G., Iqbal, J., Khan, A. A., & Shoaib, M. (2015). Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancer Investigation*, *33*(7), 318–328. https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1041642

Babiuch, K., Kuśnierz-Cabala, B., Kęsek, B., Okoń, K., Darczuk, D., & Chomyszyn-Gajewska, M. (2020). Evaluation of proinflammatory, nf-kappab dependent cytokines: Il-1α, Il-6, Il-8, and TNF-α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(3). https://doi.org/10.3390/jcm9030867

Barufaldi, L. A., Guerra, R. L., de Albuquerque, R. de C. R., Do Nascimento, A., Chança, R. D., de Souza, M. C., & de Almeida, L. M. (2021). Risk of initiation to smoking with the use of electronic cigarettes: systematic review and meta-analysis. *Ciencia e Saude Coletiva*, *26*(12), 6089–6104. https://doi.org/10.1590/1413-812320212612.35032020

Behar, R. Z., Hua, M., & Talbot, P. (2015). Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. *PLoS ONE*, *10*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117222

Beklen, A., & Uckan, D. (2021). Electronic cigarette liquid substances propylene glycol and vegetable glycerin induce an inflammatory response in gingival epithelial cells. *Human & Experimental Toxicology*, *40*(1), 25–34. https://doi.org/10.1177/0960327120943934

Bertoni, N., & Szklo, A. S. (2021). Electronic nicotine delivery systems in Brazilian state capitals: Prevalence, profile of use, and implications for the National Tobacco Control Policy. *Cadernos de Saude Publica*, *37*(7). https://doi.org/10.1590/0102-311X00261920

Binshabaib, M. S., Mehmood, A., Akram, Z., & ALHarthi, S. S. (2018). Peri-implant clinical and radiographic status and whole salivary cotinine levels among cigarette and waterpipe smokers and never-smokers. *Journal of Oral Science*, *60*(2), 247–252. https://doi.org/10.2334/josnusd.17-0221

Blake, D. J., Reese, C. M., Garcia, M., Dahlmann, E. A., & Dean, A. (2015). Soluble extracellular Klotho decreases sensitivity to cigarette smoke induced cell death in human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, *29*(7), 1647–1652. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.019

Boss, S., Bertolio, M., & Lipke, L. (2024). Inflammatory biomarker changes in healthy adults secondary to electronic cigarette use: A scoping review. *Immunity, Inflammation and Disease*, *12*(2). https://doi.org/10.1002/iid3.1170

Brailo, V., Vucicevic-Boras, V., Lukac, J., Biocina-Lukenda, D., Zilic-Alajbeg, I., Milenovic, A., & Balija, M. (2012). Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, *17*(1). https://doi.org/10.4317/medoral.17323

Buchanan, N. D., Grimmer, J. A., Tanwar, V., Schwieterman, N., Mohler, P. J., & Wold, L. E. (2020). Cardiovascular risk of electronic cigarettes: a review of preclinical and clinical studies. *Cardiovascular Research*, *116*(1), 40–50. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz256

Cao, D. J., Aldy, K., Hsu, S., McGetrick, M., Verbeck, G., De Silva, I., & Feng, S. yi. (2020). Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury. In *Journal of Medical Toxicology* (Vol. 16, Issue 3, pp. 295–310). Springer. https://doi.org/10.1007/s13181-020-00772-w

Carvalho, B. F. do C., Faria, N. de C., Silva, K. C. S., Greenfield, E., Alves, M. G. O., Dias, M., Mendes, M. A., Pérez-Sayáns, M., & Almeida, J. D. (2024). Salivary Metabolic Pathway Alterations in Brazilian E-Cigarette Users. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(21), 11750. https://doi.org/10.3390/ijms252111750

Castelblanco, E., Hernández, M., Alonso, N., Ribes-Betriu, A., Real, J., Granado-Casas, M., Rossell, J., RojoLópez, M. I., Dusso, A. S., Julve, J., & Mauricio, D. (2022). Association of α-klotho with subclinical carotid atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, *21*(1), 207. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01640-3

Cavalcante, T. M., Szklo, A. S., Perez, C. de A., Thrasher, J. F., Szklo, M., Ouimet, J., Gravely, S., Fong, G. T., & Almeida, L. M. de. (2017). Conhecimento e uso de cigarros eletrônicos e percepção de risco no Brasil: Resultados de um país com requisitos regulatórios rígidos. *Cadernos de Saude Publica*, *33*, 1–11. https://doi.org/10.1590/0102-311X00074416

Chuang, H. C., Su, C. Y., Huang, H. Y., Chien, C. Y., Chen, C. M., & Huang, C. C. (2006). High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope*, *116*(7), 1175–1179. https://doi.org/10.1097/01.mlg.0000224338.56902.28

Cichońska, D., Kusiak, A., Kochańska, B., Ochocińska, J., & Świetlik, D. (2019). Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(22). https://doi.org/10.3390/ijerph16224433

Da Silva, A. L. O., & Moreira, J. C. (2019). The ban of electronic cigarettes in Brazil: Success or failure? *Ciencia e Saude Coletiva*, *24*(8), 3013–3024. https://doi.org/10.1590/1413-81232018248.24282017

Deepthi, G., Nandan, S. R. K., & Kulkarni, P. G. (2019). Salivary tumour necrosis factor-α as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *20*(7), 2087–2093. https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2087

Dikova, V., Jantus-Lewintre, E., & Bagan, J. (2021). Potential Non-Invasive Biomarkers for Early Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(8), 1658. https://doi.org/10.3390/jcm10081658

Donate-Correa, J. (2015). Klotho in cardiovascular disease: Current and future perspectives. *World Journal of Biological Chemistry*, *6*(4), 351. https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.351

Faridoun, A., Sultan, A. S., Jabra-Rizk, M. A., Weikel, D., Varlotta, S., & Meiller, T. F. (2021). Salivary biomarker profiles in E-cigarette users and conventional smokers: A cross-sectional study. *Oral Diseases*, *27*(2), 277–279. https://doi.org/10.1111/odi.13533

Ferrari, E., Pezzi, M. E., Cassi, D., Pertinhez, T. A., Spisni, A., & Meleti, M. (2021). Salivary Cytokines as Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 6795. https://doi.org/10.3390/ijms22136795

Fountoulakis, N., Maltese, G., Gnudi, L., & Karalliedde, J. (2018). Reduced Levels of Anti-Ageing Hormone Klotho Predict Renal Function Decline in Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*(5), 2026–2032. https://doi.org/10.1210/jc.2018-00004

Ganapathy, V., Manyanga, J., Brame, L., McGuire, D., Sadhasivam, B., Floyd, E., Rubenstein, D. A., Ramachandran, I., Wagener, T., & Queimado, L. (2017). Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage. *PLoS ONE*, *12*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177780

Ganesan, S. M., Dabdoub, S. M., Nagaraja, H. N., Scott, M. L., Pamulapati, S., Berman, M. L., Shields, P. G., Ellen Wewers, M., & Kumar, P. S. (2020). *Adverse effects of electronic cigarettes on the diseasenaive oral microbiome*. http://advances.sciencemag.org/

Glasser, A., Abudayyeh, H., Cantrell, J., & Niaura, R. (2018). *Patterns of E-Cigarette Use Among Youth and Young Adults: Review of the Impact of E-Cigarettes on Cigarette Smoking*. https://doi.org/10.1093/ntr/nty103/4998820

Glogauer, J. E., Sun, C. X., Bradley, G., & Magalhaes, M. A. O. (2015). Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. *Cancer Immunology Research*, *3*(11), 1218–1226. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0017

Goertzen, C., Mahdi, H., Laliberte, C., Meirson, T., Eymael, D., Gil-Henn, H., & Magalhaes, M. (2018). Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 49). www.oncotarget.com

González-Reimers, E. (2014). Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(40), 14660. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14660

Greenfield, E., Alves, M. de S., Rodrigues, F., Nogueira, J. O., da Silva, L. F., de Jesus, H. P., Cavalcanti, D. R., Carvalho, B. F. do C., Almeida, J. D., Mendes, M. A., & Oliveira Alves, M. G. (2023). Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. *ACS Omega*, *8*(40), 36845–36855. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03683

Ho, M. Y., Tang, S. J., Chuang, M. J., Cha, T. L., Li, J. Y., Sun, G. H., & Sun, K. H. (2012). TNF-α induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3β-dependent mechanism. *Molecular Cancer Research*, *10*(8), 1109–1119. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0160

Hussain, S. P., & Harris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. In *International Journal of Cancer* (Vol. 121, Issue 11, pp. 2373–2380). https://doi.org/10.1002/ijc.23173

Instituto Nacional do Câncer - INCA. (2019, November 13). *Cigarros Eletronicos - O que Sabemos?* Https://Www.Inca.Gov.Br/Bvscontrolecancer/Publicacoes/Edicao/Cigarros_eletronicos.Pdf.

Invernizzi, G. (2011). *Persistence of systemic inflammation in COPD in spite of smoking cessation La persistenza dell'infiammazione nella BPCO nonostante la cessazione dal fumo*.

Jacobs, M., Verschraegen, S., Salhi, B., Anckaert, J., Mestdagh, P., Brusselle, G. G., & Bracke, K. R. (2022). IL-10 producing regulatory B cells are decreased in blood from smokers and COPD patients. *Respiratory Research*, *23*(1), 287. https://doi.org/10.1186/s12931-022-02208-1

Ji, E. H., Elzakra, N., Chen, W., Cui, L., Lee, E. S., Sun, B., Messadi, D., Xia, T., Zhu, Y., & Hu, S. (2019). E-cigarette aerosols induce unfolded protein response in normal human oral keratinocytes. *Journal of Cancer*, *10*(27), 6915–6924. https://doi.org/10.7150/jca.31319

Jia, S., Zhang, R., Li, Z., & Li, J. (2017). *Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer*. www.impactjournals.com/oncotarget

Jităreanu, A., Agoroaei, L., Aungurencei, O. D., Goriuc, A., Diaconu Popa, D., Savin, C., Caba, I.-C., Tătărușanu, S., Profire, B., & Mârțu, I. (2021). Electronic Cigarettes' Toxicity: From Periodontal Disease to Oral Cancer. *Applied Sciences*, *11*(20), 9742. https://doi.org/10.3390/app11209742

Juretić, M., Cerović, R., Belušić-Gobić, M., Brekalo Pršo, I., Kqiku, L., Špalj, S., Pezelj-Ribarić, S., & PezeljRibarić, S. (2013). Short Communication Salivary Levels of TNF-α and IL-6 in Patients with Oral Premalignant and Malignant Lesions (proinflammatory cytokines / premalignant / malignant lesions). In *Folia Biologica (Praha)* (Vol. 59).

Kaluarachchi, M. R., Boulangé, C. L., Garcia-Perez, I., Lindon, J. C., & Minet, E. F. (2016). Multiplatform serum metabolic phenotyping combined with pathway mapping to identify biochemical differences in smokers. *Bioanalysis*, *8*(19), 2023–2043. https://doi.org/10.4155/bio-2016-0108

Kamizono, Y., Shiga, Y., Suematsu, Y., Imaizumi, S., Tsukahara, H., Noda, K., Kuwano, T., Fujimi, K., Saku, K., & Miura, S. I. (2018). Impact of cigarette smoking cessation on plasma α-klotho levels. *Medicine (United States)*, *97*(35). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000011947

Katarina Gustafsson. (2013, September 13). *Imperial Tobacco concorda em adquirir a unidade de cigarros eletrônicos da Dragonite*. Https://Www.Bloomberg.Com/News/Articles/2013-09-02/ImperialTobacco-Agrees-to-Acquire-Dragonite-s-e-Cigarette-Unit.

Kosmider, L., Sobczak, A., Fik, M., Knysak, J., Zaciera, M., Kurek, J., & Goniewicz, M. L. (2014). Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: Effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine and Tobacco Research*, *16*(10), 1319–1326. https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078

Kuntic, I., Kuntic, M., Oelze, M., Stamm, P., Karpi, A., Kleinert, H., Hahad, O., Münzel, T., & Daiber, A. (2023). The role of acrolein for E-cigarette vapour condensate mediated activation of NADPH oxidase in cultured endothelial cells and macrophages. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *475*(7), 807–821. https://doi.org/10.1007/s00424-023-02825-9

Kyzas, P. A., Geleff, S., Batistatou, A., Agnantis, N. J., & Stefanou, D. (2005). Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*, *206*(2), 170–177. https://doi.org/10.1002/path.1776

Laffer, B., Bauer, D., Wasmuth, S., Busch, M., Jalilvand, T. V., Thanos, S., Meyer zu Hörste, G., Loser, K., Langmann, T., Heiligenhaus, A., & Kasper, M. (2019). Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00430

Lee, P. N., Coombs, K. J., & Afolalu, E. F. (2019). Considerations related to vaping as a possible gateway into cigarette smoking: an analytical review. *F1000Research*, *7*, 1915. https://doi.org/10.12688/f1000research.16928.3

Lee, S. H., & Choi, Y. H. (2013). Link between Periodontal Disease and Cancer: A Recent Research Trend. *Journal of Life Science*, *23*(4), 602–608. https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.4.602

Lin, X., Khalid, S., Qureshi, M. Z., Attar, R., Yaylim, I., Ucak, I., Yaqub, A., Fayyaz, S., Farooqi, A. A., & Ismail, M. (2016). VEGF mediated signaling in oral cancer. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-LeGrand, France)*, *62*(14), 64–68.

Lisa Cheng, Y., Jordan, L., Gorugantula, L. M., Schneiderman, E., Chen, H., & Rees, T. (2014). Salivary Interleukin-6 and -8 in Patients With Oral Cancer and Patients With Chronic Oral Inflammatory Diseases. *Journal of Periodontology*, *85*(7), 956–965. https://doi.org/10.1902/jop.2013.130320

Ma, C., Xi, B., Li, Z., Wu, H., Zhao, M., Liang, Y., & Bovet, P. (2021). Prevalence and trends in tobacco use among adolescents aged 13–15 years in 143 countries, 1999–2018: findings from the Global Youth Tobacco Surveys. *The Lancet Child and Adolescent Health*, *5*(4), 245–255. https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30390-4

Malta, D. C., Hallal, A. L. C., Machado, Í. E., Do Prado, R. R., De Oliveira, P. P. V., Campos, M. O., & De Souza, M. D. F. M. (2018). Factors associated with the use of waterpipe and other tobacco products among students, Brazil, 2015. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *21*. https://doi.org/10.1590/1980-549720180006.supl.1

Mihaila, R. G., & Todor, S. B. (2024). *Bridging Periodontal Disease and Myeloproliferative Neoplasms: The Role of Immune Dysregulation and Inflammatory Mediators*. https://doi.org/10.20944/preprints202411.0876.v1

Miluna, S., Melderis, R., Briuka, L., Skadins, I., Broks, R., Kroica, J., & Rostoka, D. (2022). The Correlation of Swedish Snus, Nicotine Pouches and Other Tobacco Products with Oral Mucosal Health and Salivary Biomarkers. *Dentistry Journal*, *10*(8). https://doi.org/10.3390/dj10080154

Modeling, L. M., Measurement, F., Snowrift, O. N., Environmental, A. R., Regional, S., Power, E., Limited,

G. C., Influence, T. H. E., Snow, O. F., On, F., Around, S., Embankment, T. H. E., Wind, I. N., Snow, B., Aspect, O. F., On, R. R., Distribution, S., Model, A. A. C., Simulation, N., … Maciejowski, J. M. (2019). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析 Title. *Journal of Wind Engineering and Industrial Aerodynamics*, *26*(3), 1–4. https://doi.org/10.1007/s11273-020-09706-3%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jweia.2017.09.008%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117919%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.coldregions.2020.103116%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jweia.2010.12.004%0Ahttp://dx.doi.o

Mokeem, S. A., Alasqah, M. N., Michelogiannakis, D., Al-Kheraif, A. A., Romanos, G. E., & Javed, F. (2018). Clinical and radiographic periodontal status and whole salivary cotinine, IL-1β and IL-6 levels in cigarette- and waterpipe-smokers and E-cig users. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *61*, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.016

Navale, A. M., Deshpande, A., Mistry, B., Chauhan, P., & Bhagat, C. (2023). Salivary Protein Biomarkers for Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, *24*(1), 114–126. https://doi.org/10.2174/1568009623666230511113916

Navazesh, M., & Kumar, S. K. S. (2008). Measuring salivary flow. *The Journal of the American Dental Association*, *139*, 35S-40S. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0353

Ng, M., Freeman, M. K., Fleming, T. D., Robinson, M., Dwyer-Lindgren, L., Thomson, B., Wollum, A., Sanman, E., Wulf, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L., & Gakidou, E. (2014). Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *JAMA*, *311*(2), 183–192. https://doi.org/10.1001/jama.2013.284692

Oliveira Alves, M. G., da Silva Miguel, N., Ferreira, C. C. P., Alvarenga, E. R., Tonon, B. M., de Barros, P. P., Carta, C. F. L., Paschoal, M. B. N., de Sales Chagas, J. F., Bandeira, C. M., Nunes, F. D., & Almeida, J. D. (2020). Expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *130*(3), 298–305. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2020.06.003

Oliveira-Campos, M., De Oliveira, M. M., Da Silva, S. U., Santos, M. A. S., Barufaldi, L. A., De Oliveira, P. P. V., Andrade, S. C. D. A., De Andreazzi, M. A. R., De Moura, L., Malta, D. C., & De Souza, M. D. F. M. (2018). Risk and protection factors for chronic noncommunicable diseases in adolescents in Brazilian capitals. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *21*. https://doi.org/10.1590/1980-549720180002.supl.1

PAHO/OPAS. (2023, December 14). *Medidas urgentes são necessárias para proteger as crianças e os jovens dos cigarros eletrônicos*.

Parikh, A. S., & Bhattacharyya, N. (2018). Patterns of concurrent cigarette, alcohol, and e-cigarette use: Off-setting or additive behaviors? *The Laryngoscope*, *128*(8), 1817–1821. https://doi.org/10.1002/lary.27133

Patel, J., Shah, F., Joshi, G., & Patel, P. (2016). Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *12*(2), 447. https://doi.org/10.4103/0973-1482.147765

Qasim, H., Karim, Z. A., Rivera, J. O., Khasawneh, F. T., & Alshbool, F. Z. (2017). Impact of Electronic Cigarettes on the Cardiovascular System. *Journal of the American Heart Association*, *6*(9). https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006353

Rapado-González, Ó., Majem, B., Muinelo-Romay, L., López-López, R., & Suarez-Cunqueiro, M. M. (2016). Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 9). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms17091531

Roberts, W., Verplaetse, T., Peltier, M. K. R., Moore, K. E., Gueorguieva, R., & McKee, S. A. (2020). Prospective association of e-cigarette and cigarette use with alcohol use in two waves of the Population Assessment of Tobacco and Health. *Addiction*, *115*(8), 1571–1579. https://doi.org/10.1111/add.14980

Rodríguez-Rabassa, M., López, P., Rodríguez-Santiago, R. E., Cases, A., Felici, M., Sánchez, R., Yamamura, Y., & Rivera-Amill, V. (2018). Cigarette smoking modulation of saliva microbial composition and cytokine levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11). https://doi.org/10.3390/ijerph15112479

Scieszka, D. P., Garland, D., Hunter, R., Herbert, G., Lucas, S., Jin, Y., Gu, H., Campen, M. J., & Cannon, J. L. (2023). Multi-omic assessment shows dysregulation of pulmonary and systemic immunity to ecigarette exposure. *Respiratory Research*, *24*(1), 138. https://doi.org/10.1186/s12931-023-02441-2

Semlali, A., Chakir, J., Goulet, J. P., Chmielewski, W., & Rouabhia, M. (2011). Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *Journal of Periodontal Research*, *46*(5), 533–541. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01370.x

Serapinas, D., Narbekovas, A., Juskevicius, J., & Sakalauskas, R. (2010). *Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status Infiammazione sistemica nella BPCO in rapporto alla condizione tabagica*.

Sgambato, J. A., Jones, B. A., Caraway, J. W., & Prasad, G. L. (2018). Inflammatory profile analysis reveals differences in cytokine expression between smokers, moist snuff users, and dual users compared to nontobacco consumers. *Cytokine*, *107*, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.11.013

Shields, P. G., Song, M.-A., Freudenheim, J. L., Brasky, T. M., McElroy, J. P., Reisinger, S. A., Weng, D. Y., Ren, R., Eissenberg, T., Wewers, M. D., & Shilo, K. (2020). Lipid laden macrophages and electronic cigarettes in healthy adults. *EBioMedicine*, *60*, 102982. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102982

Simsek Ozek, N., Zeller, I., Renaud, D. E., Gümüs, P., Nizam, N., Severcan, F., Buduneli, N., & Scott, D. A. (2016). Differentiation of Chronic and Aggressive Periodontitis by FTIR Spectroscopy. *Journal of Dental Research*, *95*(13), 1472–1478. https://doi.org/10.1177/0022034516663696

Singh, K. P., Lawyer, G., Muthumalage, T., Maremanda, K. P., Khan, N. A., McDonough, S. R., Ye, D., McIntosh, S., & Rahman, I. (2019). Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. *ERJ Open Research*, *5*(4), 00182–02019. https://doi.org/10.1183/23120541.00182-2019

Singh, P. K., Ahmad, M. K., Kumar, V., Gupta, R., Kohli, M., Jain, A., Mahdi, A. A., Bogra, J., & Chandra, G. (2017). Genetic polymorphism of interleukin-10 (-A592C) among oral cancer with squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*, *77*, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.12.011

Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 531–548). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14

Sokolovsky, A. W., Rubenstein, D., Gunn, R. L., White, H. R., & Jackson, K. M. (2023). Associations of daily alcohol, cannabis, combustible tobacco, and e-cigarette use with same-day co-use and poly-use of the other substances. *Drug and Alcohol Dependence*, *251*, 110922. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2023.110922

Soneji, S., Barrington-Trimis, J. L., Wills, T. A., Leventhal, A. M., Unger, J. B., Gibson, L. A., Yang, J. W., Primack, B. A., Andrews, J. A., Miech, R. A., Spindle, T. R., Dick, D. M., Eissenberg, T., Hornik, R. C., Dang, R., & Sargent, J. D. (2017). Association between initial use of e-cigarettes and subsequent cigarette smoking among adolescents and young adults a systematic review and meta-analysis. In *JAMA Pediatrics* (Vol. 171, Issue 8, pp. 788–797). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1488

State Fact Sheets. (2022). *Smoking & Tobacco Use* . Https://Www.Cdc.Gov/Tobacco/Stateandcommunity/State-Fact-Sheets/Index.Htm.

Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K. I., Tajima, A., Iwase, T., & Mizunoe, Y. (2013). Staphylococcus epidermidis Esp degrades specific proteins associatedwith staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1645–1655. https://doi.org/10.1128/JB.01672-12

Sun, Z., Meng, Y., Liu, G., Jiang, Y., Meng, Q., & Hu, S. (2016). Effect of interleukin-1β and tumor necrosis factor α gene silencing on mouse gastric cancer cell proliferation and migration. *Oncology Letters*, *11*(4), 2559–2565. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4253

Sundar, I. K., Javed, F., Romanos, G. E., & Rahman, I. (2016). E-cigarettes and flavorings induce inflammatory and pro-senescence responses in oral epithelial cells and periodontal fibroblasts. *Oncotarget*, *7*(47), 77196–77204. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12857

Swenson, W. G., Wuertz, B. R. K., & Ondrey, F. G. (2011). Tobacco carcinogen mediated up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, *50*(9), 668–679. https://doi.org/10.1002/mc.20775

Szadkowski, A., & Myers, C. R. (2008). Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells. *Toxicology*, *243*(1–2), 164–176. https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.004 *szklo2011*. (n.d.).

Verde, Z., González-Moro, J. M. R., Chicharro, L. M., Reinoso-Barbero, L., Bandrés, F., Gómez-Gallego, F., & Santiago, C. (2017). A Paradox: α-Klotho Levels and Smoking Intensity. *Lung*, *195*(1), 53–57. https://doi.org/10.1007/s00408-016-9944-6

Wisniewski, B. T., Sharma, J., Legan, E. R., Paulson, E., Merrill, S. J., & Manogaran, A. L. (2018). Toxicity and infectivity: insights from de novo prion formation. *Current Genetics*, *64*(1), 117–123. https://doi.org/10.1007/s00294-017-0736-1

Yao, Y., Long, Y., Du, F. W., Zhao, Y., & Luo, X. Bin. (2022). Association between serum cotinine and a-Klotho levels among adults: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2016. *Tobacco Induced Diseases*, *20*(6). https://doi.org/10.18332/tid/144622

Ye, D., Gajendra, S., Lawyer Bs, G., Bds, J., Pishey Bds, D., Pathagunti Bds, S., Lyons Rdh, J., Veazie, P., Watson, G., Mcintosh Phd, S., & Rahman, I. (2020). *Inflammatory Biomarkers and Growth Factors in Saliva and Gingival Crevicular Fluid of E-cigarette users, Cigarette smokers, and Dual smokers: A pilot study Running title: Systemic biomarkers in saliva and GCF by E-cig vaping*. https://doi.org/10.1902/jper.10528

York, A. G., Skadow, M. H., Oh, J., Qu, R., Zhou, Q. D., Hsieh, W.-Y., Mowel, W. K., Brewer, J. R., Kaffe, E., Williams, K. J., Kluger, Y., Smale, S. T., Crawford, J. M., Bensinger, S. J., & Flavell, R. A. (2024). IL-10 constrains sphingolipid metabolism to limit inflammation. *Nature*, *627*(8004), 628–635. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07098-5

FIGURES AND TABLES

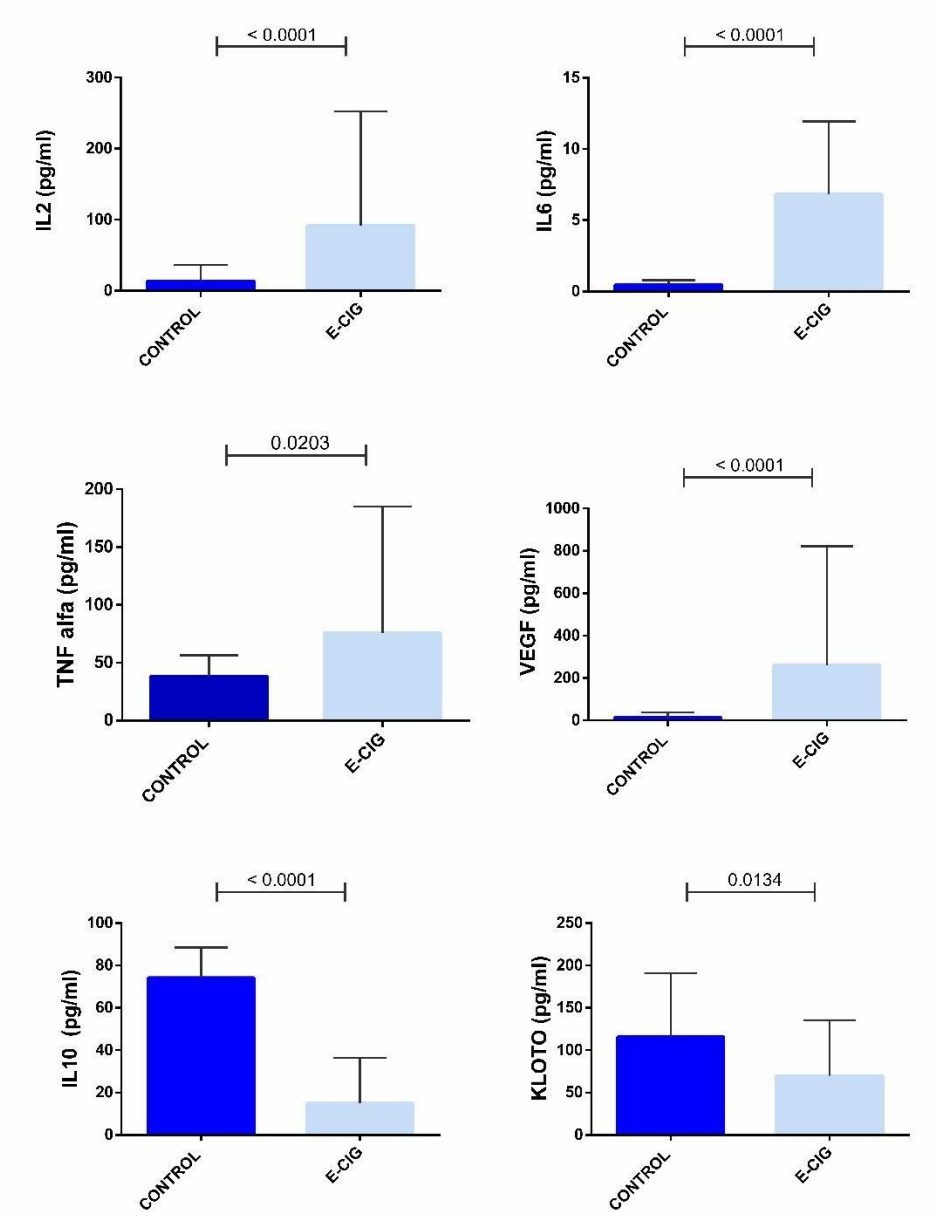


Figure 1. Distribution of expression of the cytokines studied in each group and statistical significance of the comparisons.

		Age	Duration of Electronic Cigarette Use (years)	Frequency of Electronic Cigarette Use per Week	Number of Sessions per Day	Duration per Session (minutes)	Amount of E-liquid per Day (ml)	Amount of Nicotine per Day (ml)	Alcohol-Related Risk	Alcohol Intake per Day	Simultaneous Use of Ecigarettes and Alcohol	Increase in Ecigarette Use with Alcohol Consumption
IL2	Spearman Correlation Coefficient	0,057	-0,014	-0,059	-0,054	0,169	-0,220	0,120	0,392	0,235	0,065	-0,376
	p-value	0,787	0,948	0,779	0,798	0,419	0,364	0,615	0,078	0,306	0,768	0,066
IL6	Spearman Correlation Coefficient	0,313	0,429	0,257	0,246	-0,168	0,417	-0,308	-0,015	-0,117	0,282	0,097
	p-value	0,128	**0,032***	0,216	0,236	0,422	0,096	0,187	0,948	0,612	0,192	0,721
TNF	Spearman Correlation Coefficient	0,131	0,012	-0,025	-0,274	-0,204	-0,072	0,049	-0,283	0,276	0,480	-0,314
	p-value	0,534	0,955	0,904	0,185	0,327	0,742	0,837	0,213	0,227	**0,020***	0,115
VEGF	Spearman Correlation Coefficient	-0,075	0,361	0,208	0,170	-0,353	0,251	-0,250	-0,082	-0,087	0,133	0,078
	p-value	0,722	0,077	0,319	0,418	0,083	0,329	0,287	0,723	0,706	0,547	0,776
KLOTO	Spearman Correlation Coefficient	-0,027	-0,190	0,248	0,157	-0,164	0,395	0,124	0,241	-0,105	0,207	0,146

	p-value	0,898	0,364	0,232	0,453	0,433	0,117	0,601	0,293	0,651	0,344	0,590
IL10	Spearman Correlation Coefficient	0,194	0,143	0,005	-0,044	0,436	0,026	0,097	0,103	-0,359	0,135	0,136
	p-value	0,352	0,497	0,981	0,834	**0,029***	0,922	0,686	0,658	0,110	0,539	0,615

Table 1. Spearman's correlation analysis between the expression of the cytokines studied and clinical findings in the e-cigarette group

APÊNDICE 2 – Ficha de coleta de dados sobre o estudo

Parte I – Dados gerais e consumo de carcinógenos

Nome:	
Sexo:	Cor:
Idade:	Data Nasc:
Residência:	
Bairro:	Cidade:
Estado:	Fone:
Profissão:	
Você fuma?	
Se fuma, qual o tipo?	
Há quanto tempo?	
Qual a frequência do seu consumo de cigarros?	
Quantos cigarros/dia?	
Caso ex-fumante, parou há quanto tempo?	
Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?	
Sim	Não
Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?	
Diário (>1x/dia)	Diário (1 x ao dia)
1 a 3 vezes por semana	Mensal
Que tipo de bebida você consome quando bebe?	
Cerveja	Uísque
Batida	Vinho
Caipirinha	Outras
Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?	
1 a 2	10 ou mais
3 a 4	Cerveja 350 ml
5 a 6	Vinho 120 ml

7 a 9	Destilado (whisky, vodca, pinga) 36 ml
Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?	
Sim	Não
Quando você bebe, consome mais cigarro?	
Sim	Não
Quanto a mais você consome?	
Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas?	
Sim	Não
Quais?	
Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?	
Diário (>1x/dia)	1 a 3 vezes por semana
Diário (1 x ao dia)	Mensal
Faz uso de algum medicamento?	
Sim	Não
Qual(is)?	
Em relação aos seus hábitos sexuais, você pratica ou praticou sexo oral?	
Sim	Não

Fonte: Elaborada pelo autor.

Exame clínico:

1) Extra-bucal

2) Intra-bucal

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – Artigo 1

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES - UMC/SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da saliva de usuários de narguilé e cigarros industrializados
Pesquisador: Monica Ghislaine Oliveira Alves
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 50462621.0.0000.5497
Instituição Proponente: Universidade de Mogi das Cruzes - UMC/SP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.964.698

Apresentação do Projeto:
O projeto pretende avaliar jovens e jovens adultos usuários de narguilé (30 indivíduos), cigarro industrializado (30 indivíduos) comparativamente a grupo controle não tabagista (30 indivíduos). O foco é identificar biomarcadores a partir da saliva. Foi realizado correções no projeto de acordo com os apontamentos realizados no primeiro parecer. Foram redefinidos os benefícios, o cronograma e o recrutamento.

Objetivo da Pesquisa:
Em texto informado pelo pesquisador, são os seguintes os objetivos deste protocolo de pesquisa:

Objetivo Geral
A proposta do presente trabalho é avaliar o perfil dos biomarcadores salivares para tabagismo em pacientes com o hábito de fumar narguilé e em usuários de cigarros industrializados, por meio de diversas metodologias.

Objetivos Específicos
- Avaliar o perfil de metabólitos salivares em pacientes com o hábito de fumar narguilé e em usuários de cigarros industrializados.
- Avaliar o perfil de proteínas salivares em pacientes com o hábito de fumar narguilé e em usuários de cigarros industrializados.

- Quantificar cotinina salivar como biomarcador de tabagismo em pacientes com o hábito de fumar narguilé e em usuários de cigarros industrializados, traçando assim um perfil com o tempo e frequência deste consumo.
- Avaliar biomarcadores salivares de tabagismo por espectroscopia de absorção do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em pacientes com o hábito de fumar narguilé e em usuários de cigarros industrializados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Em texto informado pelo pesquisador, são os seguintes os riscos e benefícios deste protocolo de pesquisa:

RISCOS
A coleta da saliva é um procedimento não invasivo sem risco de dor ou injuria ao paciente, apesar disso, pode haver desconforto social de cuspir em um recipiente estéril. Para evitar esse risco, os pacientes estarão em local privado para coleta, na presença do pesquisador.

BENEFÍCIOS
Os benefícios diretos de sua participação nesta pesquisa são preventivos em relação à saúde bucal e geral já que será submetido a exame clínico dentro e fora de sua boca. Além do avanço em estudos relacionados à prevenção do desenvolvimento de câncer bucal.

Como descrito acima, pacientes tabagistas apresentam maior risco de desenvolvimento diversas doenças, entre elas câncer oral. Torna-se necessário então a intervenção para abstenção do hábito como método de prevenção para esses pacientes. Desta forma, os pacientes tabagistas da amostra serão encaminhados para clínica de disciplina de Diagnóstico e Propedêutica Clínica
Aplicada a Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Mogi das Cruzes, onde serão atendidos pela Profa. Dra. Monica Ghislaine Oliveira Alves e equipe, por meio do protocolo da estratégia "Abordagem breve/mínima/básica na cessação do tabagismo" recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e descrita pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) no Programa Nacional de Controle do Tabagismo (INCA, 2021).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
O estudo é relevante, uma vez que busca avaliar metabólitos bucais de tabagistas usuários de

narguilé e cigarros industrializados comparativamente a não tabagistas.
De acordo com os apontamentos reportado pelo pesquisador em carta resposta foi confirmada todas as modificações no projeto e TCLE dos 5 itens em COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA realizados no parecer versão 1.
Todas as alterações foram identificadas nos documentos e estão adequadas não havendo nenhum impedimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os documentos TCLE, e FOLHA DE ROSTO foram apresentados pelo pesquisador.
O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido menciona os procedimentos a que os participantes serão submetidos, os riscos e benefícios da realização da pesquisa e ressalta a garantia dos direitos dos sujeitos da pesquisa quanto à informação, privacidade e encaminhamento. Indica que os itens mencionados estão sob responsabilidade do pesquisador responsável e da instituição onde os dados serão coletados em consonância à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS. As informações aos participantes da pesquisa sobre o acesso ao pesquisador e o CEP estão devidamente contempladas no TCLE.
Todas as modificações solicitadas para serem feitas no TCLE foram realizadas de forma adequada não havendo nenhum impedimento ético.

Recomendações:
Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Todos os apontamentos apresentados em COMENTÁRIOS e CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA foram adequadamente respondidos e corrigidos no projeto e TCLE.
Não foram observados nenhum impedimento ético.

Considerações Finais a critério do CEP:
Este parecer foi liberado "ad referendum" em acordo com o artigo 15 do Regimento Interno do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos da Universidade de Mogi das Cruzes visando agilização de processo.

O CEP, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, solicita ao

pesquisador responsável que encaminhe o relatório final ou cópia da publicação do artigo ou resumo referentes a este projeto quando da conclusão do mesmo.

Havendo qualquer evento adverso ou qualquer mudança no projeto que envolva direta ou indiretamente o participante da pesquisa, deve o pesquisador entrar em contato imediatamente com o sistema CEP/CONEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1790546.pdf	03/09/2021 13:43:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_REVISADO_apos_parecer.pdf	03/09/2021 13:43:15	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	03/09/2021 13:42:22	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_REVISADO_apos_parecer.pdf	03/09/2021 13:41:24	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Cronograma	Cronograma_REVISADO_apos_parecer.pdf	03/09/2021 13:40:33	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	termo_de_autorizacao_UNESP.pdf	29/07/2021 18:41:59	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	termo_de_autorizacao_USP.pdf	26/07/2021 14:53:13	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	termo_de_autorizacao_UNIFESP.pdf	26/07/2021 14:52:41	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	termo_de_autorizacao_UFABC.pdf	26/07/2021 14:52:02	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Outros	termo_de_autorizacao_UMC.pdf	17/07/2021 23:26:20	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Revisada.pdf	17/07/2021 23:20:01	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	carta_de_encaminhamento.pdf	13/07/2021 16:28:17	Monica Ghislaine Oliveira Alves	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MOGI DAS CRUZES, 11 de Setembro de 2021

Assinado por:
Marcia Aparecida Silva Bissaco
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 ¿ Prédio 2 ¿ Sala 21-21 - Centro Cívico
Bairro: Prédio II, sala 2121(UMC) **CEP:** 08.780-911
UF: SP **Município:** MOGI DAS CRUZES
Telefone: (11)4798-7085 **Fax:** (11)4798-7085 **E-mail:** cep@umc.br

ANEXO 2 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – Artigo 2

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 36911420.0.0000.0077
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.397.780

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

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos:Os procedimentos para coleta de células e saliva da boca não causam dor ou desconforto no momento, mas existe a possibilidade de pequena sensibilidade na borda da língua após a coleta da citologia esfoliativa. Em relação a confidencialidade das informações, os pesquisadores se comprometem a manter os dados armazenados em sigilo e segurança.
Benefícios:Os benefícios diretos de participação nesta pesquisa são preventivos em relação à saúde bucal e geral, já que todos os participantes serão submetidos a exame clínico dentro e fora de sua boca. Além disso, a participação nesta pesquisa
contribuirá para o avanço dos estudos relacionados ao entendimento dos efeitos do cigarro eletrônico sobre a mucosa da boca.

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

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

Continuação do Parecer: 4.397.780

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

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

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

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 13 de Novembro de 2020

Assinado por:
Maria Aparecida Neves Jardini
(Coordenador(a))

ANEXO 3 - AUDIT

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

PROGRAMA GERAL DE SAÚDE E SEGURANÇA DO TRABALHADOR

AUDIT – TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROBLEMAS RELACIONADOS AO USO DE ÁLCOOL

DADOS PESSOAIS

NOME

ORIENTAÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO TESTE

O uso de álcool pode afetar sua saúde e pode interferir com algumas medicações e tratamentos. Por isso é importante que você responda sobre o seu uso de álcool. *Suas respostas permanecerão confidenciais.*

Por favor, responda com toda a sinceridade.

Assinale com "X" a alternativa que melhor descreve sua resposta a cada questão.

UM *DRINK ou* UMA DOSE =



1 dose de destilado (whisky, vodka, pinga), 40ml, ou 1 coquetel:

1. Com que freqüência (quantas vezes por semana) você consome bebidas alcoólicas?				
( ) Nunca [0]	( ) Uma vez por mês ou menos[1]	( ) 2-4 vezes por mês[2]	( ) 2-3 vezes por semana[3]	( ) 4 ou mais vezes por semana[4]
2. Quantas doses de álcool você consome num dia normal?				
( ) 0 ou 1 [0]	( ) 2 ou 3 [1]	( ) 4 ou 5 [2]	( ) 6 ou 7 [3]	( ) 8 ou mais [4]
3. Com que freqüência (quantas vezes por semana) você consome cinco ou mais doses em uma única ocasião?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
4. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você achou que não conseguiria parar de beber, uma vez tendo começado?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
5. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você não conseguiu fazer o que era esperado de você por causa do álcool?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
6. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você precisou beber pela manhã para poder se sentir bem ao longo do dia, após ter bebido bastante no dia anterior?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
7. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você se sentiu culpado ou com remorso após ter bebido?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
8. Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você foi incapaz de lembrar o que aconteceu devido à bebida?				
( ) Nunca [0]	( ) Menos que uma vez por mês [1]	( ) Uma vez por mês[2]	( ) Uma vez por semana [3]	( ) Quase todos os dias [4]
9. Você já causou ferimentos ou prejuízos a você mesmo ou a outra pessoa após ter bebido?				
( ) Não [0]		( ) Sim, mas não no último ano[2]		( ) Sim, durante o último ano [4]
10. Alguém ou algum parente, amigo ou médico, já se preocupou com o fato de você beber ou sugeriu que você parasse?				
( ) Não [0]		( ) Sim, mas não no último ano[2]		( ) Sim, durante o último ano [4]

RESULTADO DO TESTE	
NOME RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TESTE	
DATA	

Consumo de baixo risco ou abstêmios = 0 a 7 pontos

Consumo de risco = 8 a 15 pontos

Uso nocivo ou consumo de alto risco = 15 a 19 pontos

Provável dependência = 20 ou mais pontos (máximo = 40 pontos)

AUDIT_com escore_para entrevistador-1.doc Criado por xp