UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
LURYE SILVA THEODORO

IDENTIFICAÇÃO DE ONCOMETABÓLITOS SALIVARES EM PACIENTES FUMANTES DE NARGUILÉ E CIGARRO CONVENCIONAL

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

LURYE SILVA THEODORO

IDENTIFICAÇÃO DE ONCOMETABÓLITOS SALIVARES EM PACIENTES FUMANTES DE NARGUILÉ E CIGARRO CONVENCIONAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.
Área de Concentração: Engenharia Biomédica.

Orientadora: Dra. Mônica Ghislaine Oliveira Alves

Coorientadora: Elis Andrade de Lima Zutin

MOGI DAS CRUZES, SP

2025

FINANCIAMENTO





Ficha catalográfica

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Theodoro, Lurye Silva
T388i Identificação de oncometabólitos salivares em pacientes fumantes de narguilé e cigarro convencional / Lurye Silva Theodoro. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
66 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Mônica Ghislaine Oliveira Alves
Coorientadora: Profa. Dra. Elis Andrade de Lima Zutin

1. Fumantes 3. Saliva 4. Biomarcadores 5. Neoplasias I. Alves, Mônica Ghislaine Oliveira II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 613.85

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

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas e trinta minutos do dia quatorze de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada "IDENTIFICAÇÃO DE ONCOMETABÓLITOS SALIVARES EM PACIENTES FUMANTES DE NARGUILÉ E CIGARRO CONVENCIONAL" para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Lurye Silva Theodoro**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 49 (quarenta e nove), a saber: 25 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Mônica Ghislaine Oliveira Alves, e Caio Junji Tanaka, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Fernanda Alves Feitosa, da Universidade Estadual Paulista, sob a presidência da primeira, como orientadora da dissertação. A sessão pública da defesa de dissertação foi aberta pela senhora presidenta da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, 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, 14 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Profª Drª Fernanda Alves Feitosa	aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Caio Junji Tanaka	aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))
Profª Drª Mônica Ghislaine Oliveira Alves	aprovada (aprovado(a)/reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

Ao Universo por estar aqui, realizando o maior dos meus sonhos.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado, me incentivando, segurando minhas mãos, secando minhas lágrimas e sorrindo por verem meu sucesso.

Ao meu marido, Claudio Dias de Moura Junior, que esteve ao meu lado sempre que precisei de apoio e força.

A minha orientadora, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, pela paciência, conselhos e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento do projeto.

Ao Doutor David Aciole Barbosa, pela sua atenção, tempo e disponibilidade, sua participação foi fundamental durante todo o desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Doutor Felipe Oliveira pela participação no desenvolvimento dos resultados, sua participação também foi essencial para esse projeto.

A profissional Ellen Greenfield, seu projeto foi base para que esse estudo fosse concluído.

Aos meus professores do Programa Integrado de Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes, por fazerem parte da minha formação.

Aos meus professores da graduação e especialização de odontopediatria da Universidade de Mogi das Cruzes, que me fizeram ter certeza da minha vontade de ser professora e seguir na vida acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio à bolsa nº 2018/23248-1 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Dedico esse projeto aos meus pais, por sempre acreditarem na minha capacidade e investirem em mim.

Ana Theodoro, seu cuidado e dedicação foram o que me deram, em alguns momentos, conforto para seguir.

Renê Theodoro, sua presença significou segurança e certeza de que não estava sozinha nessa caminhada.

“Aproveite as oportunidades que a vida lhe oferece.
Encontre os oásis em seus desertos.
Os perdedores vêem os raios.
Os vencedores vêem a chuva e com ela a oportunidade de cultivar”.

(Augusto Cury)

RESUMO

O estudo teve como objetivo estabelecer uma correlação entre os oncometabólitos salivares, dados clínicos e a quantificação de cotinina salivar em pacientes com o hábito de fumar narguilé, cigarros industrializados e em não fumantes, na tentativa de observar relação entre as características clínicas e os achados metabólicos. O estudo incluiu 26 fumantes frequentes e exclusivos de cigarros industrializados no grupo do cigarro, 33 fumantes frequentes e exclusivos de narguilé, enquanto o grupo de controle foi composto por 30 indivíduos não fumantes. A saliva total não estimulada foi recolhida para análise. Os dados do perfil metabólico foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massas, e as correlações foram feitas com os níveis de cotinina medidos por teste imunoenzimático (ELISA), bem como com os dados clínicos através de análise estatística na plataforma MetaboAnalyst 6.0. Foi utilizada a opção de análise estatística, formato dos dados em colunas e tipo em picos de intensidade. O processamento foi analisado no modelo linear, e o seu resultado foi representado pelo gráfico Volcano. Foram considerados apenas os metabólitos presentes no 2º quadrante superior, devido ao seu maior grau de relevância em relação ao menor valor de p ($p \leq 0,05$), correlacionando com os dados clínicos e o consumo de tabaco entre os fumantes. Notavelmente, o ácido lático, a fucose, a sarcosina, a prolina e o gliceraldeído destacaram-se pelas suas propriedades como biomarcadores oncológicos, oncometabólitos e propriedades mutagênicas.

Palavras-chave: narguilé; cigarro; metaboloma; saliva.

ABSTRACT

The study aimed to establish a correlation between salivary oncometabolites, clinical data and the quantification of salivary cotinine in patients with the habit of smoking hookah, industrialized cigarettes and in non-smokers, to observe the relationship between clinical characteristics and metabolic findings. The study included 26 frequent and exclusive smokers of industrialized cigarettes in the cigarette group, 33 frequent and exclusive hookah smokers, while the control group consisted of 30 people of non-smokers. Unstimulated total saliva was collected for analysis. Metabolic profile data were obtained using gas chromatography coupled to a mass spectrometer, and correlations were made with cotinine levels measured by an immunoenzymatic test (ELISA), as well as with clinical data using statistical analysis on the MetaboAnalyst 6.0 platform. The statistical analysis option, data format in columns and type in intensity peaks were used. The processing was analyzed in the linear model, and its result was represented by Volcano plot. Only metabolites present in the 2nd upper quadrant were considered, due to their greater degree of relevance in relation to the lowest p-value ($p \leq 0.05$), correlated with clinical data and tobacco consumption among smokers. Notably, lactic acid, fucose, sarcosine, proline and glyceraldehyde stood out due to their properties as oncological biomarkers, oncometabolites and mutagenic properties.

Keywords: hookah; cigarette; metabolome; saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Prevalência de indicadores do tabaco em escolares, por faixa etária entre os anos de 2015 (Cinza escuro) e 2019 (Cinza claro) 13
Gráfico 2 – Prevalência de escolares (13–17 anos) que experimentaram narguilé segundo Unidades Federativas.....15
Figura 1 – Esquema de organização dos microtubos e concentração final da solução padrão de cotinina após diluição seriada.....25
Quadro 1 – Disposição das amostras na microplaca.....25
Figura 2 – Fluxograma sobre a coleta das amostras, análises dos testes estatísticos e plataforma metaboanalyst 6.0.....28
Figura 3 – Descrição das etapas de seleção dos metabólitos.....29
Qaudro 2 – Perfil quanto idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo de tabaco e escore do risco relacionado ao álcool dos pacientes estudados nos grupos cigarro, narguilé e controle.....30
Figura 4 – Comparação das concentrações de cotinina salivar entre os grupos.....31
Figura 5 – Comparação entre as concentrações de cotinina salivar entre pacientes do sexo masculino e feminino do grupo narguilé e cigarro.....31
Quadro 3 – Quantificação da cotinina nos grupos Narguilé e Cigarro.....32
Gráfico 3 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Cotinina.....33
Gráfico 4 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Audit.....33
Gráfico 5 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Sessão.....34
Gráfico 6 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Álcool.....34
Gráfico 7 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Idade.....35
Gráfico 8 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Sexo.....35
Gráfico 9 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica Tempo de consumo.....36

Gráfico 10 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé para variável clínica dose de álcool.....36
Quadro 4 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo narguilé após utilização da plataforma metaboanalyst 6.0 pra cada variável clínica.....37
Gráfico 11 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica Idade.....38
Gráfico 12 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica sexo.....38
Gráfico 13 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica Tempo de consumo.....39
Gráfico 14 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica sessão.....39
Gráfico 15 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica quantificação salivar da cotinina.....40
Gráfico 16 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica uso de álcool.....40
Gráfico 17 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica dose de álcool.....41
Gráfico 18 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro para variável clínica audit.....41
Quadro 5 – Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro após utilização da plataforma MetaboAnalyst 6.0 para cada variável clínica.....42
Quadro 6 – Resultado dos metabólitos significantes para cada variável clínica.....43
Figura 6 – Processo de glicólise (Via glicolítica) 46
Figura 7 – Metabolismo celular da célula normal e célula tumoral (efeito Warburg) 47
Figura 8 – Alterações teciduais associadas ao ácido lático.....48
Figura 9 – Alterações teciduais associadas a fucose.....49
Figura 10 – Alterações teciduais associadas a prolina.....51
Figura 11 – Alterações teciduais associadas a sarcosina.....52
Figura 12 – Alterações teciduais associadas ao gliceraldeído.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IDH	Índices de desenvolvimento humano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-CIG	Cigarros eletrônicos
CYP2A6	Cytochrome P450 2A6
NaChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
AUDIT	Alcohol Use Disorder Identification Test
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa triplo quadrupolo
QC	Quality Control
ELISA	Teste imunoenzimático
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
IQR	Interquantile range
LC-MS/MS	Espectrometria de massa associado a cromatografia líquida
LDH	Lactato desidrogenase
ATP	Trifosfato de adenosina
HNSCC	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
LDHA	Lactato desidrogenase A
TCR	Receptor de células T
NSCLC	Tumor de pulmão de células não pequenas
FUT8	Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase
PRODH	Prolina desidrogenase
POX	Prolina oxidase
p53	Proteína tumoral 53
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
SARDH	Sarcosina desidrogenase
TCA	Ácido tricarboxílico
HK	Hexoquinase
GPI	Fosfoglicose isomerase
TPI	Triose-fosfato isomerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....12
1.1 Epidemiologia do tabagismo.....12
1.2 Tabagismo e carcinogênese.....13
1.3 Narguilé.....14
1.4 Fluído salivar.....16
1.5 Cotinina.....16
1.5 Metaboloma.....17
2 OBJETIVOS.....20
3 MATERIAS E MÉTODOS.....21
3.1 Triagem dos indivíduos.....21
3.2 Procedimentos prévios à coleta de amostras de saliva do paciente.....22
3.3 Coleta de fluxo salivar.....22
3.4 Avaliação dos metabólitos por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa triplo quadrupolo (GC-MS).....23
3.5 Avaliação da cotinina por meio do método ELISA para quantificação de cotinina.24
3.6 Análises estatísticas.....26
3.7 Critérios para seleção dos metabólitos.....28
4 RESULTADOS.....30
4.1 Caracterização da amostra e perfil quanto ao uso de carcinógenos.....30
4.2 Cotinina.....31
4.3 Seleção dos metabólitos.....32
4.4 Metabólitos do grupo narguilé.....33
4.5 Metabólitos do grupo cigarro.....37
4.6 Resultado da seleção dos metabólitos em ambos os grupos.....43
5 DISCUSSÃO.....44
6 CONCLUSÃO.....54
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Tabagismo

A saúde pública enfrenta diariamente uma luta contra a utilização de produtos derivados de tabaco e a dependência à nicotina, sendo necessário a criação de programas para tabagistas e campanhas que visam informar a população acerca dos malefícios causados pela utilização. Com isso, essa parte da população se enquadra em um grupo de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), e com isso, associação direta com taxa mais elevada de mortalidade e morbidade. Ao redor do mundo, cerca de 1,3 bilhão de pessoas são tabagistas, e segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 7 Milhões de pessoas por ano, tem seus óbitos declarados em razão da utilização desses produtos[1].

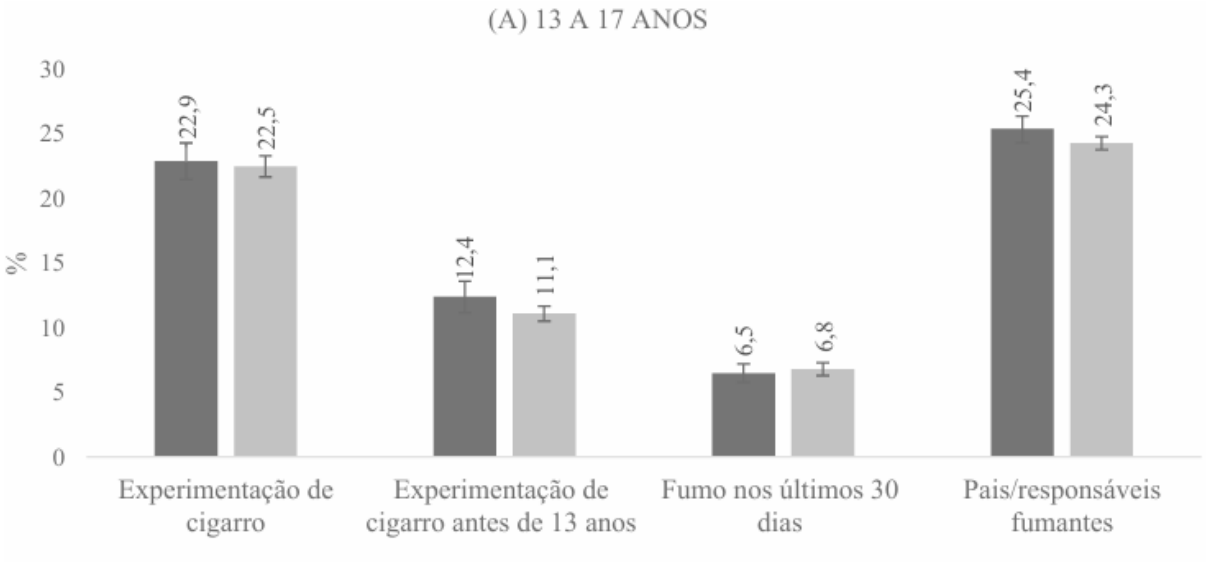
Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2024, cerca de 12% de todas as mortes que ocorreram no Brasil são atribuíveis ao tabagismo. Tendo uma média diária de óbitos de 477 pessoas. Desta forma, cerca de 153.5 bilhões de reais são gastos no Brasil com despesas médicas, cuidados informais e perda de produtividade atribuídas ao tabagismo. Cerca de 121.397 mil infartos e internações por doenças cardíacas, 56.714 acidentes vasculares encefálicos e 78.905 diagnósticos de câncer estão associados aos hábitos tabagistas por ano. Entre as mortes anuais atribuíveis ao tabaco estão: 40.567 por doenças pulmonar obstrutiva crônica, 30.871 por doenças cardíacas, 26.583 por câncer de pulmão e 20.010 por tabagismo passivo[2].

Entre os produtos de tabaco consumidos no Brasil, os cigarros convencionais são os mais populares. Entretanto, o mercado tabagista tem se modificado, com importação e comercialização cada vez maior de produtos como narguilé e cigarros eletrônicos. A faixa etária que mais utiliza esses novos produtos são adolescentes e adultos jovens, diferente dos cigarros convencionais[3]. A utilização e consumo desses produtos são prejudiciais à saúde, podem gerar complicações bucais e alterações carcinogênicas[4].

Os países das Américas, como o Brasil e os Estados Unidos, tem demonstrado uma redução no consumo desses produtos nos últimos anos. Estima-se que essa diminuição esteja associada as políticas públicas. Contudo, é preciso intensificar esses esforços, pois a taxa de tabagismo não apresentou uma redução significativa[5]. A Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar, realizada entre os anos de 2015 e 2019,

que explora a prevalência de indicadores de tabaco em escolas do Brasil, demonstrou que as políticas públicas voltadas para o combate ao consumo, não estão sendo suficientes. O gráfico 1 demonstra o consumo de tabaco no Brasil entre os adolescentes de 13 a 17 anos mantém-se próximo[6].

Gráfico 1 - Prevalência de indicadores do tabaco em escolares, por faixa etária entre os anos de 2015 (Cinza escuro) e 2019 (Cinza claro)



Fonte: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (2015; 2019)

1.2 Tabagismo e carcinogênese bucal

O carcinoma de células escamosas bucal (CCE) é o tipo de câncer de boca mais frequente no Brasil, representando entre 90% e 95% dos casos[7] com predominância na região lateral da língua[8]. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a estimativa para o biênio 2023-2025 indica 10.900 novos diagnósticos em homens e 4.200 em mulheres, correspondendo a um risco de 10,30 casos por 100 mil homens e 3,83 por 100 mil mulheres. Esse tipo de câncer ocupa a quarta posição entre as neoplasias malignas mais incidentes no sexo masculino e a décima terceira entre as mulheres nas regiões mais afetadas[9].

Assim como outras neoplasias malignas, o CCE resulta de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, sendo a carcinogênese oral um processo multifatorial de evolução prolongada, com forte influência de fatores ambientais, especialmente o tabagismo em suas diversas formas[10].

As análises das fumaças dos produtos com tabaco apresentam substâncias como monóxido de carbono, nitrogênio, nicotina e radicais livres, como superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio e oxigênio reativo. O potencial risco de desenvolvimento de câncer oral, se dá pela presença dos radicais livres que são inalados, causando danos oxidativos[11,12] e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), gerando alterações genéticas irreversíveis[13]. A iniciação, promoção e progressão tumoral estão diretamente relacionadas a presença dos radicais livres, aumentando o risco do desenvolvimento de câncer, inclusive na cavidade oral[11,14].

Diante desse cenário, é fundamental monitorar indivíduos de alto risco, uma vez que a detecção precoce tem grande relevância para a saúde pública[15]. Dessa maneira, os profissionais da área da saúde, incluindo cirurgiões-dentistas, devem estar atentos a possíveis alterações clínicas e adotar condutas adequadas para o diagnóstico precoce, contribuindo para a melhoria da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes[16].

1.3 Narguilé

Como reflexo de políticas públicas de prevenção e estabelecimento de ambientes livres de fumo, os índices demonstraram a redução do tabagismo na população brasileira nas últimas décadas, especialmente os usuários de cigarro convencional. Entretanto, houve aumento no uso de outras formas de consumo, como a utilização de narguilé e de cigarros eletrônicos[17,18].

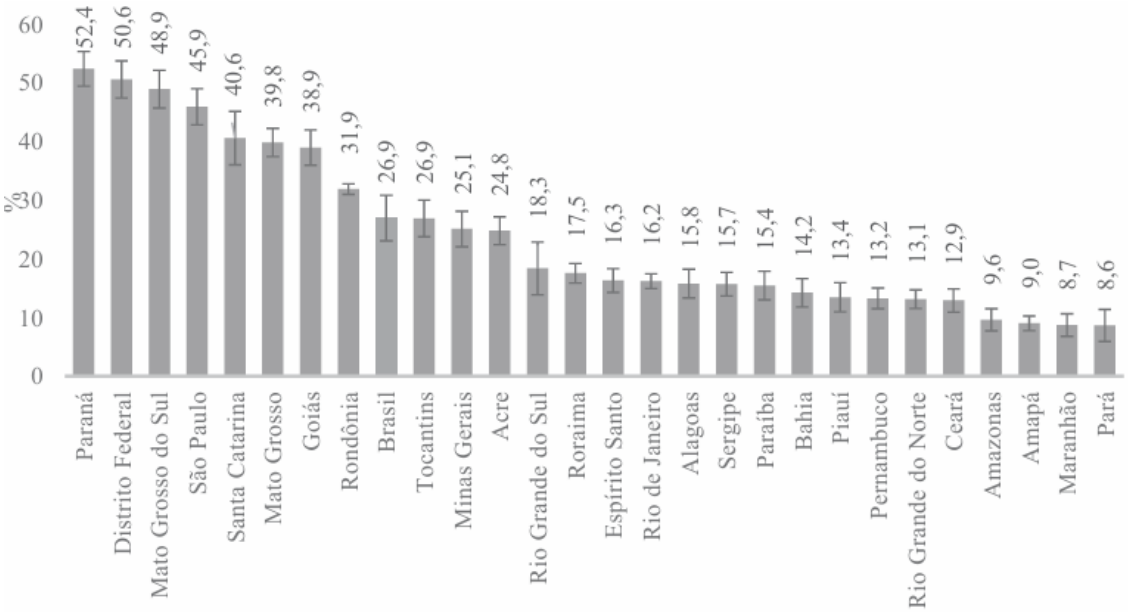
As instituições de saúde e governos têm se mobilizado para combater e proibir diversas formas de tabaco, mas a indústria tem se organizado com criação de estratégias inovadoras de produtos, a fim de manter a lucratividade deste mercado[18,19]. Esses novos produtos de nicotina que dominam o mercado brasileiro, se tornaram comum nos Estados Unidose em outras regiões do mundo[20].

O aumento do consumo tem sido observado principalmente entre adolescentes e jovens adultos[21,22], sendo consumida em uma frequência alta e erroneamente anunciada como segura. Apesar da indústria promover uma mensagem de segurança no consumo, esses produtos contêm nicotina, e muitas vezes, sua concentração é desconhecida, sendo mascarada por cores e novos sabores, a fim de atrair novos clientes[19,23].

O narguilé é um dispositivo para fumo de tabaco, dependendo da região também é conhecido como hookah ou shisha[24]. Funciona como um cachimbo, fornilho para o tabaco, um corpo, um vaso para água, uma mangueira e um bocal. Durante a utilização, a pressão exercita pelo usuário dentro da mangueira, faz com que a fumaça passe pelo dispositivo e saia pelo bocal[25].

O mercado procurou se atualizar em relação aos produtos, com novas essências herbais com alta concentração de açúcar. A Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar, realizada em 2019, também explora a prevalência de indicadores de narguilé em unidades federativas brasileiras, demonstrando que as políticas públicas voltadas para o combate ao consumo de narguilé precisam ser ajustadas ao público mais jovem[6].

Gráfico 2 - Prevalência de escolares (13–17 anos) que experimentaram narguilé segundo Unidades Federativas



Fonte: Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (2019)

É muito comum a crença da população que essa prática de consumo de tabaco seja menos danosa que o consumo de cigarro convencional, pois a fumaça é filtrada pela água. Entretanto, há a presença de mais de 82 substância químicas na fumaça aspirada, sendo 23 com potencial cancerígeno[24].

Assim, substâncias presentes no narguilé apresentam-se como prejudiciais à mucosa bucal, favorecendo à carcinogênese oral[26,27]. Além disso, o consumo de

tabaco por meio de narguilé altera a capacidade de tamponamento salivar[28], estar associado a alterações genotóxicas[29] e epigenéticas teciduais na mucosa oral[30].

1.4 Fluído salivar

A saliva desempenha um papel crucial na saúde e bem-estar humanos, apesar de não ser imediatamente fatal se perdida. Este fluido complexo desempenha inúmeras funções, incluindo mastigação, deglutição e percepção do paladar. Desempenha importante papel na proteção de tecidos orais contra dessecação, ulceração e potenciais carcinógenos, ao mesmo tempo que promove o reparo do tecido mole. Ela mantém o equilíbrio ecológico oral por meio de atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais. A saliva regula o pH oral, contribui para o controle do pH da placa e neutraliza os ácidos de refluxo no esôfago. Ela também desempenha um papel vital na integridade dos dentes por meio da limpeza mecânica, maturação do esmalte e remineralização. Além disso, a saliva auxilia no equilíbrio hídrico e pode ter funções hormonais no trato gastrointestinal[31].

Por apresentar propriedades exclusivas, a saliva é considerada a primeira linha de defesa do corpo ao estresse oxidativo provocado pela fumaça do tabaco e a liberação dos radicais livres[32.] As características do sistema antioxidante presentes na saliva, representam uma proteção contra as lesões. Quando esse sistema falha a mucosa oral fica mais propensa a ter alterações teciduais[33].

Os biomarcadores são substâncias, estruturas ou processos mensuráveis que podem indicar ou prever estados de saúde e doença, sendo classificados como marcadores de exposição, efeito e suscetibilidade[34]. A identificação desses marcadores após a exposição a agentes tóxicos, como o tabaco, é essencial para avaliar riscos à saúde[35]. Neste contexto, a saliva se destaca como uma importante ferramenta diagnóstica, pois contém biomarcadores em diversas formas, como DNA, RNA, proteínas, lipídios e anticorpos. Alterações nesses componentes podem sinalizar o desenvolvimento ou progressão de doenças, permitindo uma detecção precoce e menos invasiva de alterações sistêmicas e locais[36,37].

Dada a necessidade de métodos de rastreamento oncológico sensíveis, específicos, acessíveis e não invasivos, o diagnóstico salivar surge como uma alternativa viável. Ele possibilita a identificação de biomarcadores associados a

doenças bucais e sistêmicas, contribuindo para o diagnóstico precoce e a prevenção dessas condições[38,39].

1.5 Cotinina

A cotinina é o produto de biotransformação da nicotina, destacando-se como o marcador biológico de tabagismo mais utilizado[40]. Cerca de 70% a 80% da nicotina é metabolizado em cotinina pelo fígado, nesse processo é utilizada enzima hepática Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6)[41].

A cotinina é uma agonista fraca dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), sua potência é de magnitude inferior à da nicotina. Sendo a nicotina, a principal substância responsável pelo vício associado aos produtos, ativando os (nAChRs) para desenvolverem seus efeitos[42].

A nicotina apresenta uma meia-vida de 1 a 2 horas, e a presença na corrente sanguínea de 10-50 ng/ml. A cotinina tem uma meia-vida de 15 a 19 horas, e sua presença na corrente sanguínea é mais evidente com cerda de 250-900 ng/ml. Com as características metabólicas da cotinina é possível utilizá-la como biomarcador para identificação de usuários de tabaco e na avaliação da atividade da enzima (CYP2A6)[43]. Além da meia-vida mais longa da cotinina, existe outra vantagem na sua utilização como biomarcador de tabaco, pois cerca de 72% da nicotina é convertida em cotinina[44].

Desta forma, é possível encontrar a cotinina em diversos fluídos corporais, como, plasma, saliva e urina[45]. Por meio da análise laboratorial da quantificação da cotinina pode -se fornecer informações precisas sobre o estado de tabagismo do usuário e/ou sua exposição a fumaça[46], sendo sua mensuração na saliva um método seguro e conveniente para avaliação da exposição à nicotina[40].

1.6 Metaboloma

A avaliação do perfil metabólico de alta resolução tem sido utilizado para estabelecer uma nova visão do método de análise metabolômica. Assim, propiciar uma compreensão maior das respostas biológicas. Esse tipo de análise permite a identificação e quantificação dos metabólitos, que estão relacionados tanto a exposição a substâncias exógenas quanto aos processos endógenos[47].

As análises metabolômicas são clafissicadas levando em consideração suas abordagens: Metabolômica de Alvo e Metabolômica Global. A tipo alvo é determinada por uma classe química, realizando uma análise quantitativa de um ou mais metabólitos. A tipo global, utilizada no presente estudo, apresenta uma análise qualitativa, considerando o máximo de metabólitos e diversas classes químicas[48].

Os processos regulatórios celulares têm como característica a formação de metabólitos no processo final, sendo considerado as taxas produzidas uma resposta do sistema biológico as alterações[49]. As análises metabolômicas são relevantes em diversas áreas da ciência, englobando análises clínicas, alimentares, questões ambientais, toxicologia forense e análise de organismo patológicos[33].

Os metabólitos não são apenas produtos de reações metabólicas, mas reconhecidos pela relevância como moléculas indicadoras da regulação dos processos celulares[50]. As células malignas ou pertencentes a transformação genética, tem como características principais a reprogramação metabólica[51]. Desta forma, o desenvolvimento de tumores e proliferação celular das células malignas, está associado a utilização de metabólitos para estimular ou propiciar um meio favorável, utilizando intermediários como metabolização do carbono, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos[52].

Garcia *et al.,2014* observaram metaboloma de urina diferencial entre fumantes e não fumantes[53]. Jones *et al.,*2016 mostraram que a exposição ao tabaco leva a alterações metabólicas complexas, afetando o metabolismo lipídico e xenobiótico, aminoácidos e vias de purina e pirimidina[54]. Hsu *et al*., 2017 identificaram 31 metabólitos afetados pelo tabagismo agudo, incluindo mentol-glicuronídeo e vários glicerofosfolipídios, com diferenças observadas de gênero e raça[55].

Essas descobertas demonstram que a metabolômica pode contribuir significativamente para detectar danos relacionados ao tabaco e identificar novos biomarcadores, o que pode melhorar a detecção precoce de doenças e informar a regulamentação de produtos de tabaco. Sendo possível concluir que trabalhos que avaliam o perfil metabólico são de grande valia quando o interesse é compreender os biomarcadores salivares do câncer oral[56].

Em um estudo prévio dos resultados preliminares, foi avaliado o metaboloma salivar de fumantes de narguilé e de cigarros convencionais, comparando-se os grupos entre si e elegendo-se os metabólitos mais abundantes em cada um dos grupos. Foi evidenciado as diferenças metabólicas entre os grupos e alterações

metabólicas mais significativas associadas ao uso do tabaco de narguilé[57]. No entanto, esse estudo não incluiu a correlação entre os oncometabólitos salivares detectados, os dados clínicos dos fumantes e a quantificação da cotinina salivar.

2 OBJETIVOS

A proposta da pesquisa é estabelecer uma correlação entre os oncometabólitos salivares, dados clínicos e a quantificação de cotinina salivar em pacientes com o hábito de fumar narguilé, cigarros industrializados e em não fumantes, na tentativa de observar relação entre as características clínicas e os achados metabólicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Triagem dos Indivíduos

É importante destacar que os métodos e resultados aqui apresentados são uma continuação do projeto que teve seus resultados publicados em 2023, em que se explorou as descobertas preliminares sobre o metaboloma salivar de fumantes de narguilé e cigarro[57].

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Mogi das Cruzes, com o número de parecer número 1033312 e CAEE: 50462621.0.0000.5497 (Anexo 1).

A amostra de interesse foi coletada utilizando coleta de saliva total dos indivíduos. Ela foi composta pelos seguintes grupos:

a. Grupo Controle: Este grupo consistiu em 30 indivíduos não fumantes que nunca foram expostos ao fumo passivo, de acordo com as informações fornecidas pelos próprios pacientes.

b. Grupo Cigarro: O Grupo Cigarro incluiu 26 indivíduos que eram fumantes regulares de cigarros industrializados, consumindo no mínimo uma média de 10 cigarros por dia ao longo de dois anos.

c. Grupo Narguilé: O Grupo Narguilé consistiu em 32 indivíduos que eram fumantes regulares de narguilé, participando de pelo menos duas sessões por semana ao longo de dois anos.

A coleta utilizada para avaliar esses grupos eram amostras orais e periféricas coletadas na abrangência da área de atuação da equipe de Saúde da Família no município de Suzano e amostras coletadas na clínica odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Mogi das Cruzes. Entre os critérios de inclusão estão indivíduos do sexo masculino e feminino, sem histórico pessoal de câncer oral, sem sinais clínicos visíveis de qualquer desordem no local examinado e sem doença sistêmica.

Assim, os participantes foram submetidos a exames clínicos intra e extraorais e a um questionário por meio de uma entrevista, onde foram feitas perguntas sobre a condição geral de saúde. Ao analisar o perfil tabágico, eles foram questionados sobre o consumo atual de tabaco, idade, tipo, quantidade e tempo de consumo de tabaco e outros. O Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT), foi usado para determinar

o escore de risco relacionado ao consumo de álcool em quatro padrões: baixo risco, uso de risco, uso nocivo e possível dependência.

3.2. Procedimentos prévios à coleta de amostras de saliva do paciente

O preparo dos pacientes para a coleta de saliva seguiu um procedimento rigoroso, visando minimizar variabilidades nos componentes salivares. As etapas desse processo foram:

1. Horário de Coleta: Todas as amostras foram coletadas no intervalo das 10:00 às 12:00 horas. Essa faixa de horário foi escolhida com o propósito de reduzir a variabilidade nos componentes da saliva ao longo do dia.
2. Bochecho com Água Destilada: Para evitar contaminação com detritos bucais, os pacientes realizaram um bochecho com água destilada durante 1 minuto. Esse bochecho foi efetuado 10 minutos antes do momento da coleta.
3. Jejum: As coletas de saliva foram realizadas, no mínimo, 60 minutos após a ingestão de alimentos. Dessa forma, o paciente precisava estar em jejum alimentar durante esse período.
4. Abstinência de Álcool: Além do jejum alimentar, também foi exigido um período de, no mínimo, 12 horas sem consumir álcool antes da coleta de saliva.
5. Escovação dental: Os pacientes foram orientados a não escovar os dentes nas duas horas anteriores à coleta de saliva.

Esses procedimentos garantem que as amostras de saliva estejam o mais livres possível de interferências externas e proporcionam uma base sólida para a realização das análises necessárias.

3.3 Coleta de fluxo salivar

Para a coleta de saliva, os indivíduos permaneceram em uma posição sentada, em um ambiente calmo e bem ventilado, seguindo as condições mencionadas anteriormente. A saliva foi coletada de forma não estimulada, através da expectoração em tubos plásticos descartáveis (Falcon®, Rio de Janeiro), seguindo o método modificado de Navazesh. Os pacientes foram instruídos a expelir 3 mL de saliva nos tubos plásticos, que foram hermeticamente fechados e imediatamente colocados em gelo. Após a coleta, os tubos foram armazenados a -80°C até o momento das análises.

3.4 Avaliação dos metabólitos por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa triplo quadrupolo (GC-MS)

A etapa de análise metabolômica foi realizada em colaboração com o Laboratório Dempster, no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP). As amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente, e 300 µL de cada uma fòram secos utilizando o aparelho Speedvac. Posteriormente, adicionamos 300 µL de metanol, agitados por 02 segundos em agitador do tipo vortex, e novamente colocados em aparelho Speedvac. Após o processo de extração, foi realizada a derivatização, adicionando a cada eppendorf 150 µL de uma mistura igual de bistrimetilsilil-trifluoroacetamida (250 µL) e uma mistura de solventes, acetonitrila (125 µL), diclorometano (100 µL), ciclohexano(25 µL) - (v/v 5:4:1) com 5% de trietilamina (25µL).

As amostras foram agitadas novamente por 02 segundos em agitador do tipo vortex e mantidas em banho térmico a 60°C por 1 hora. As amostras após banho térmico, foram agitadas e centrifugadas por 2 segundos (13000 rpm). O sobrenadante foi transferido para um tubo Vial com insert (CMS 123TAT, Brasil). Para garantir todo o processo de extração e derivação dos metabólitos, adicionou-se um padrão interno de metionina sulfonada. As amostras foram analisadas, por um equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (GC-MS) triplo quadrupolo (TQ 8050 Shimadzu), sob as seguintes condições:

- Método de análise MRM;
- Tempo de corrida a 67 minutos;
- Temperatura de injeção à 280ºC
- Temperatura da interface à 280ºC;
- Temperatura da fonte de ionização à 200ºC;
- Taxa de aquecimento de 100ºC à 320ºC, com uma rampa linear de 4ºC/min, permanecendo nessa temperatura por 8 minutos.
- As amostras foram analisadas em triplicatas. Brancos foram analisados a fim de excluir os contaminantes de solventes. Amostras de quality control (QC), foram intercaladas entre as amostras de interesse para análises estatísticas. Os

parâmetros de identificação de íons basearam-se em um tempo de retenção de 0.02s e 90% dos íons.

3.5 Avaliação da cotinina por meio do método ELISA para quantificação de cotinina

A detecção da cotinina salivar será realizada pelo teste imunoenzimático (EXAME ELISA). Primeiramente, os reagentes e a placa de microtitulação do kit serão deixados a temperatura ambiente por no mínimo 1,5 h.

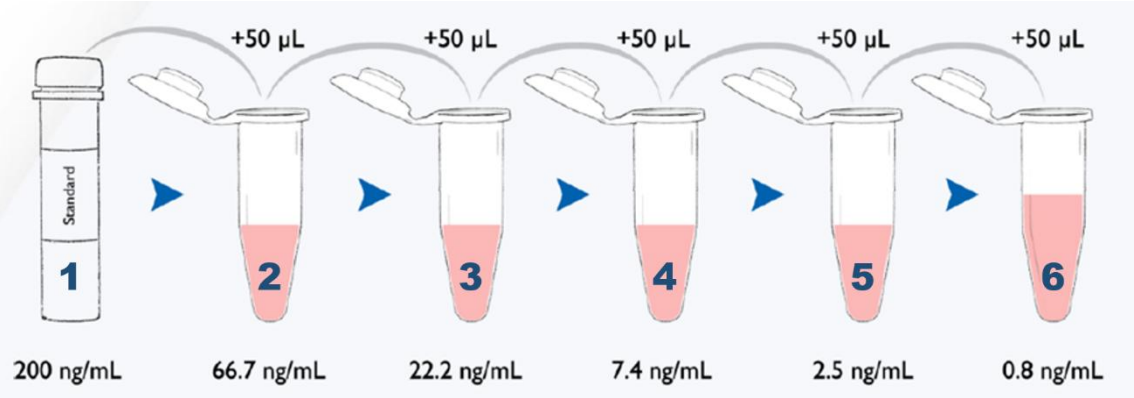
O tampão de lavagem (1X) deve ser preparado por meio da diluição do tampão de lavagem concentrado (10X) em água deionizada. Este procedimento deve ser realizado com os reagentes em temperatura ambiente.

A seguir, serão preparadas as diluições seriadas da solução padrão de cotinina. Para tanto, será necessário:

- Identificar a solução padrão de cotinina com o número 1 e mais 5 microtubos Eppendorf com números de 2 a 6;
- Pipetar 100 µL do reagente de diluição nos tubos de 2 a 6;
- Homogeinizar a solução padrão de cotinina em agitador vórtex;
- Fazer a diluição seriada (3X) da solução padrão de cotinina (200 ng/mL), adicionando 50 µL no microtubo 2 e homogeneizando;
- Trocar as ponteiras do pipetador, remova 50 µL do microtubo 2 e passe para o microtubo 3. Fazer a homogeneização novamente.
- Executar o mesmo procedimento nos microtubos 4, 5 e 6.

Ao final, teremos as seguintes concentrações nos microtubos 1 a 6, respectivamente: 200 ng/mL, 66,7 ng/mL, 22,2 ng/mL, 7,4 ng/mL, 2,5 ng/mL e 0,8 ng/mL, conforme mostrado na figura1.

Figura 1 - Esquema de organização dos microtubos e concentração final da solução padrão de cotinina após diluição seriada



Fonte: Elaborado pelo autor

Então, a placa será colocada na estufa a 37ºC. Segue a disposição das amostras padrão e amostras teste (quadro 1).

Quadro 1 - Disposição das amostras na microplaca. P = amostras padrão; T = amostras teste; Zero = reagente diluente; Branco = água deionizada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	T1	T1								
B	P2	P2	T2	T2								
C	P3	P3	T3	T3								
D	P4	P4	T4	T4								
E	P5	P5	T5	T5								
F	P6	P6	T6	T6								
G	Zero	Zero	T7	T7								
H	Branco	Branco	T8	T8								

Fonte: Elaborado pelo autor

Será pipetado 15 mL do reagente diluente num tubo Falcon e 50 µL do conjugado de enzima (1:300) para cada placa usada. Será misturado o conteúdo do tubo no vórtex e adicionado 100 µL da mistura em cada poço da microplaca. Será acrescentado também 100 µL do antissoro conitina, exceto nos poços em branco.

A placa será então coberta com o adesivo (presente no kit) e será colocada num agitador orbital, pré-aquecido a 37ºC, a 500 rpm por 1,5 h, mantendo a temperatura.

Após o passo anterior, a placa será lavada 4 vezes com o tampão de lavagem (1X). Para a lavagem, o conteúdo da placa deve ser descartado e 300 µL de tampão

de lavagem devem ser acrescentados nos poços. Em seguida o conteúdo deve ser descartado e a placa cuidadosamente enxugada com toalhas de papel antes de retornar a sua posição usual. Este procedimento deve ser repetido 4 vezes.

Depois de secas as placas, 200 µL da solução do substrato TMB devem ser adicionados em cada poço. Então a placa deverá seguir para o agitador orbital, por 5 min, a 500 rpm e incubada sob abrigo da luz em temperatura ambiente por mais 25 min. Passado esse tempo, 50 µL da solução de parada serão adicionados a cada poço.

A placa será então colocada mais uma vez em agitador orbital, por 3 min, a 500 rpm. Após esse passo, a placa deve ser lida imediatamente sob os comprimentos de onda de 450 nm para obtenção da densidade óptica e 620 a 630 nm para correção.

Os grupos receberam o tratamento estatístico teste de Kruskal-Wallis e as associações entre as variáveis, pelo teste de comparação múltipla de Dunn e dados clínicos foram exploradas por meio do coeficiente de correlação de Spearman, com $p < 0,05$ indicando uma diferença significativa.

3.6 Análises Estatísticas

Para avaliação de cotinina, os grupos receberam o tratamento estatístico teste de Kruskal-Wallis e as associações entre as variáveis, pelo teste de comparação múltipla de Dunn e dados clínicos foram exploradas por meio do coeficiente de correlação de Spearman, com $p < 0,05$ indicando uma diferença significativa.

Os dados brutos da tabela, gerados a partir das análises conduzidas pela cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) foram processados de forma a reter os dados quantitativos da cotinina. Os dados foram configurados no Excel, organizados seguindo critérios:

1- Nomes de amostra devem ser 100% iguais entre arquivo de dados (metaboloma) e metadados (dados dos pacientes), isso inclui todos os caracteres.
2- Removido ou substituído todas as vírgulas dos nomes de metabólitos, visto que o arquivo é separado por vírgulas, isso quebra a estrutura do arquivo. Nos anexos foi substituído por "_" e removidos os " ' ".
3- Conferido se o arquivo estava separado por vírgulas (dependendo do modo como o arquivo foi criado/editado, ficam ";" ao invés de vírgulas).

Após essa etapa, a tabela foi importada na plataforma online MetaboAnalyst, versão 6.0 (disponível em: metaboanalyst.ca/docs/About.xhtml, mantido e atualizado pela XiaLab na McGill University, Canadá), da seguinte maneira: utilizou-se a opção análise estatística (Metadad table), formato dos dados (Samples in columns), tipo do arquivo (Peak intensisties), design do estudo (Multiple factors / covariates), arquivos de dados (tabela do metaboloma) e arquivos de metadados (tabela dos dados clínicos e cotinina).

Após submissão, houve a avaliação das informações do processamento de dados e prosseguiu para próxima etapa (Meta-data check), nela os metadados (sexo; idade; uso de álcool; dose; audit; quantidade; tempo; quantidade de cotinina) foram categorizados em relação ao tipo de dado (continuous / categorical), apenas sexo e uso de álcool foram categorizados como categóricos.

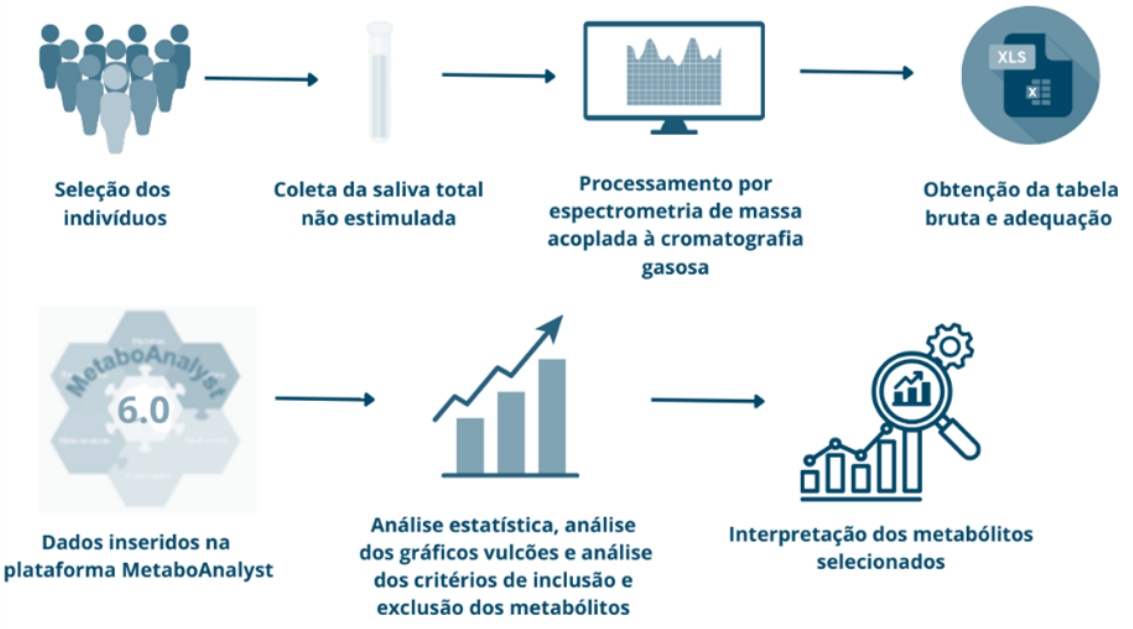
Na filtragem de dados, as opções foram oferecidas pela plataforma, onde o filtro de confiabilidade não estava assinalado, filtro de variação (Interquantile range – IQR) com porcentagem de filtro de 10%, filtro de abundância (Mean intensity value) com porcentagem de filtro de 0%.

Na visão geral da normalização, as opções foram oferecidas pela plataforma, onde não foram assinalados nenhuma normalização para amostra, transformação de dados e dimensionamento de dados. Após essa etapa, o processamento dos dados foi realizado e opção analisada foi modelos lineares com ajustes de covariáveis.

Os dados foram normalizados e processados, o teste estatístico avaliou estatisticamente a significância dos dados levando em consideração valor-p de 0,05, e seu resultado foi representado no gráfico de vulcão (1ª etapa). Essas análises foram conduzidas para comparar pares de grupos (Dados clínicos e cotinina do grupo não tabagista X metaboloma do grupo não tabagista; Dados clínicos e cotinina do grupo usuários de cigarro convencional X metaboloma do grupo usuários de cigarro convencional; Dados clínicos e cotinina do grupo usuários de narguile X metaboloma do grupo usuários de narguile).

O fluxograma (Figura 2) sumariza o processo realizado desde a coleta das amostras, análises dos testes estatístico e até inserção na plataforma Metaboanalyst 6.0.

Figura 2 - Fluxograma sobre a coleta das amostras, análises dos testes estatístico e plataforma Metaboanalyst 6.0



Fonte: Elaborado pelo autor

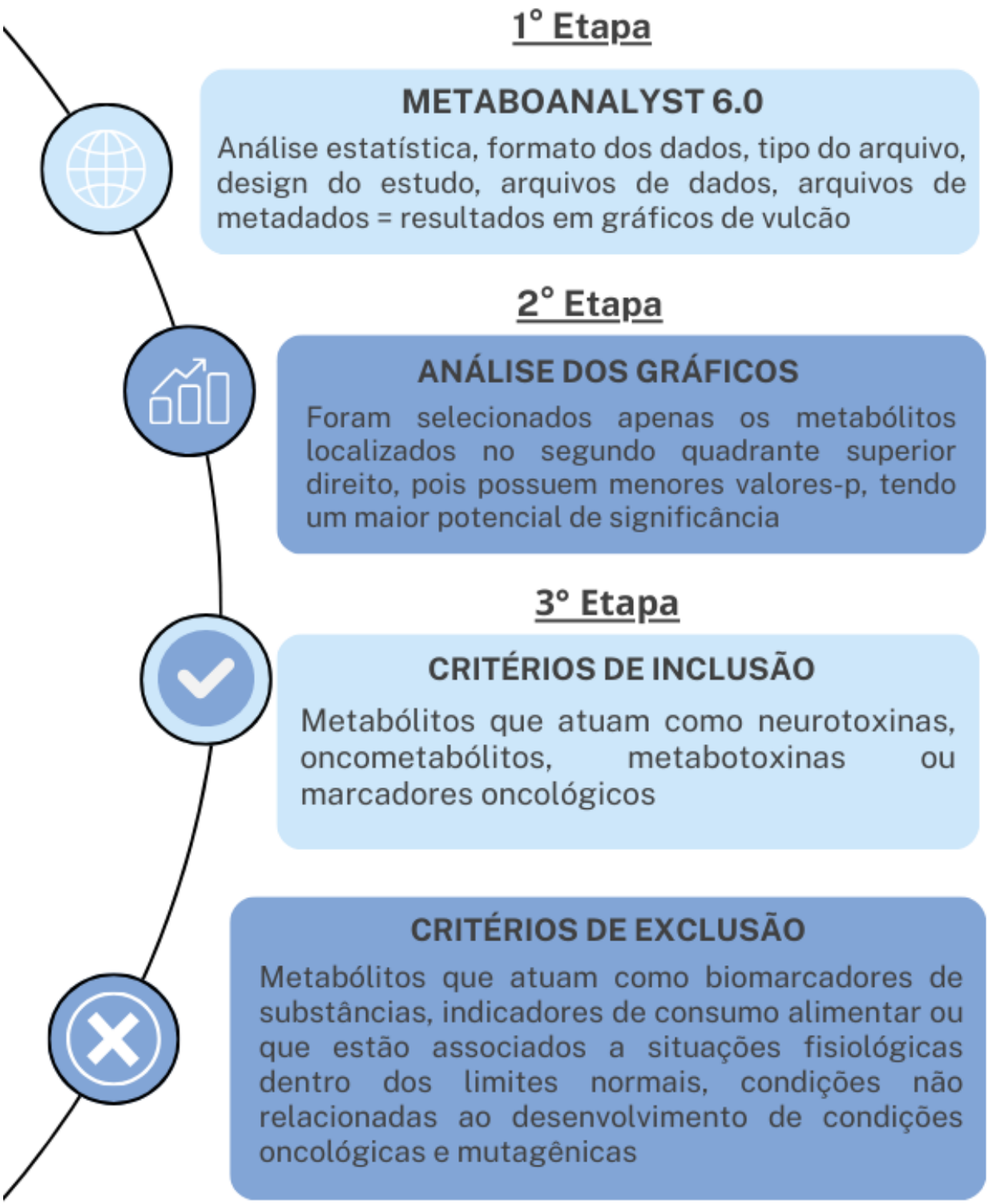
3.7 Critérios para seleção dos metabólitos

Os gráficos de vulcão construídos na 1ª etapa foram analisados observando a diferença da média entre as variáveis, sua posição horizontal representa a magnitude do dado analisado (eixo X). O eixo Y, representa o logaritmo negativo na base 10 do valor-p associado à estatística de teste em cada variável. Quanto mais distantes da origem encontram-se o metabólito, maior significância, pois os valores-p são menores. Desta forma, foi realizado a seleção apenas os metabólitos localizados no segundo quadrante superior direito dos gráficos vulcões (2ª etapa), já que apresentavam menores valores-p, e assim maior potencial de significância por sua posição de destaque.

Na 3ª etapa foram aplicados critérios de inclusão e exclusão, sendo incluído apenas os metabólitos classificados como oncometabólitos, neurotoxinas, metabotoxinas ou marcadores oncológicos. Já os critérios de exclusão abrangeram metabólitos cuja função se restringe a biomarcadores de substâncias, indicadores de consumo alimentar ou associados a condições fisiológicas dentro dos limites normais, sem relação com o desenvolvimento de processos oncológicos ou mutagênicos.

A figura 3 sumariza o processo descrito de análise de inclusão e exclusão dos metabólitos.

Figura 3 - Descrição das etapas de seleção dos metabólitos



Fonte: Elaborado pelo autor

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra e perfil quanto ao uso de carcinógenos

Utilizamos uma amostra de conveniência, a qual foi composta da seguinte maneira: os grupos de amostras foram compostos por 26 indivíduos do grupo cigarro, 33 indivíduos do grupo narguilé e 30 indivíduos do grupo controle. A tabela 1 demonstra o perfil quanto à idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo de tabaco e escore do risco relacionado ao álcool dos pacientes estudados nos três grupos.

Quadro 2 - Perfil quanto idade, sexo, consumo de tabaco, tempo de consumo de tabaco e escore do risco relacionado ao álcool dos pacientes estudados nos grupos cigarro, narguilé e controle

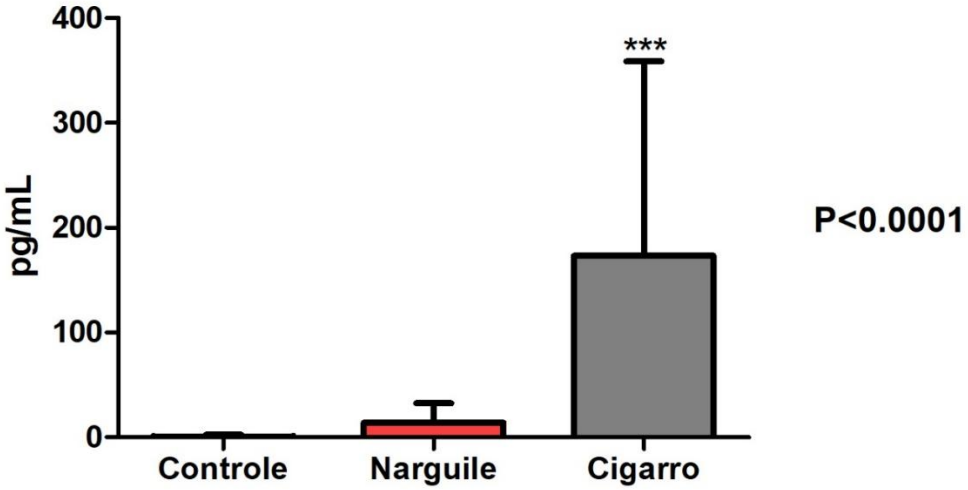
		Grupo Cigarro n=26	**Grupo Narguilé n=33**	**Grupo Controle n=30**
Idade (anos)	**Média**	29,77	20,97	25,6
	Desvio padrão	5,72	3,3	7,29
	Intervalo	20-38	15-31	18-43
Sexo	**Masculino**	13	9	7
	Feminino	13	24	23
Consumo de tabaco	**Média***	15,42	5,24	NA
	Desvio padrão*	5,19	5,02	NA
Tempo de consumo de tabaco	**Média****	12,42	4, 03	NA
	Desvio padrão**	4,92	1,63	NA
Escore do risco relacionado ao álcool	**Baixo risco**	20	20	27
	Uso de risco	6	9	2
	Uso nocivo	0	2	0
	Provável dependência	0	2	0
NA: Não se aplica				

Fonte: Adaptado de estudo prévio conduzido pelo grupo[57].

4.2 Cotinina

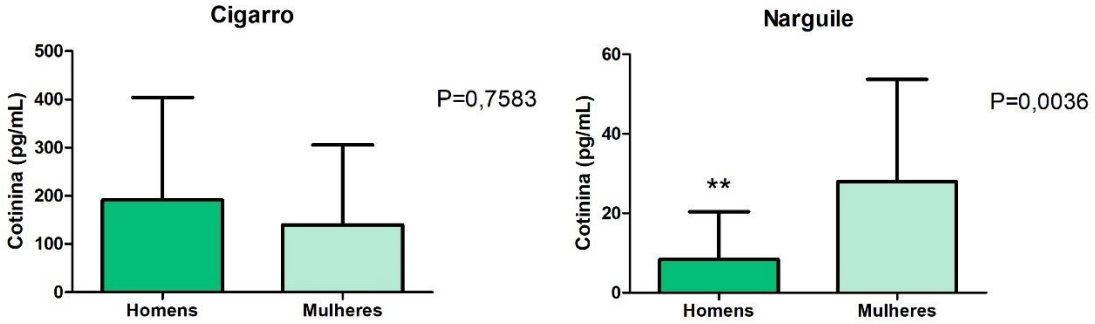
A figura 4 apresenta a comparação entre as concentrações de cotinina salivar encontrada nos grupos controle e narguilé usando o teste t de Student. A comparação entre as concentrações de cotinina salivar entre pacientes do sexo masculino e feminino do grupo narguilé e cigarro pode ser observada na figura 5.

Figura 4 - Comparação das concentrações de cotinina salivar entre os grupos



Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 5 - Comparação entre as concentrações de cotinina salivar entre pacientes do sexo masculino e feminino do grupo narguilé e cigarro



Fonte: Elaborado pelo Autor

A correlação em relação a quantificação de cotinina salivar e os outros dados clínicos no grupo narguilé e no grupo Cigarro foi explorada usando o teste de

correlação de Spearman e pode ser observada na tabela 2. Não houve diferenças estatisticamente significantes**.**

Quadro 3 - Quantificação da Cotinina nos grupos Narguilé e Cigarro

		Idade	Dose de álcool (dose/dia)	Escore do risco relacionado ao álcool	Consumo semanal	Tempo de consumo (anos)
Quantidade de cotinina salivarem pacientes usuários de narguilé	Coeficiente de correlação de Spearman	0,1429	0,2682	0,1966	0,1012	-0,361
	p-valor	0,4277	0,1313	0,2729	0,5754	0,059
Quantidade de cotinina salivar em pacientes usuários de cigarros industrializados	Coeficiente de correlação de Spearman	0,3345	-0,2348	-0,4127	0,1266	0,1917
	p-valor	0,0948	0,2483	0,0603	0,5377	0,3482

Fonte: Elaborado pelo Autor

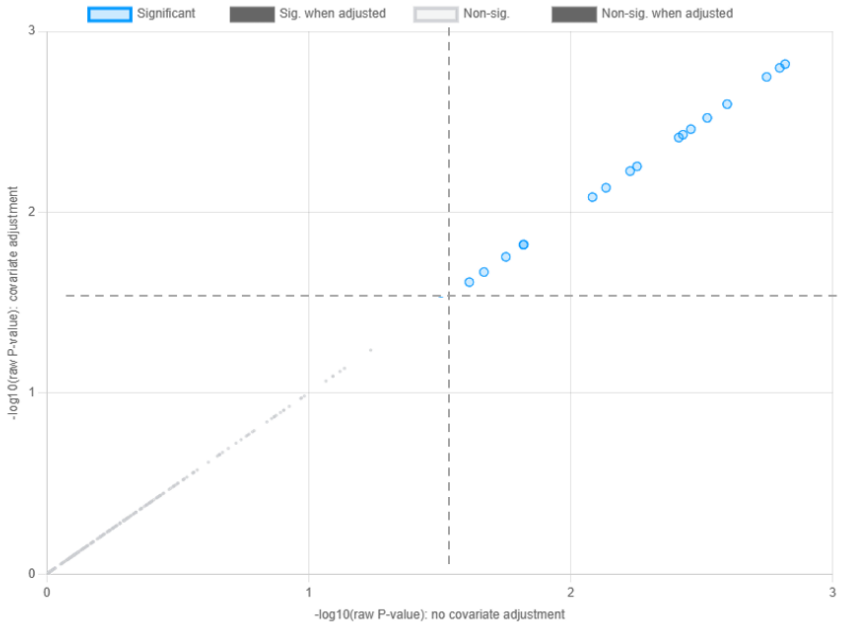
4.3 Seleção dos metabólitos

Na análise laboratorial foram encontrados 339 metabólitos. Para cada variável clínica, o gráfico de vulcão foi explorado, usando os critérios de idade dos pacientes, sexo, tempo de utilização, quantidade de cotinina, uso de álcool, audit, dose e quantidade/sessão.

4.4 Metabólitos do grupo narguilé

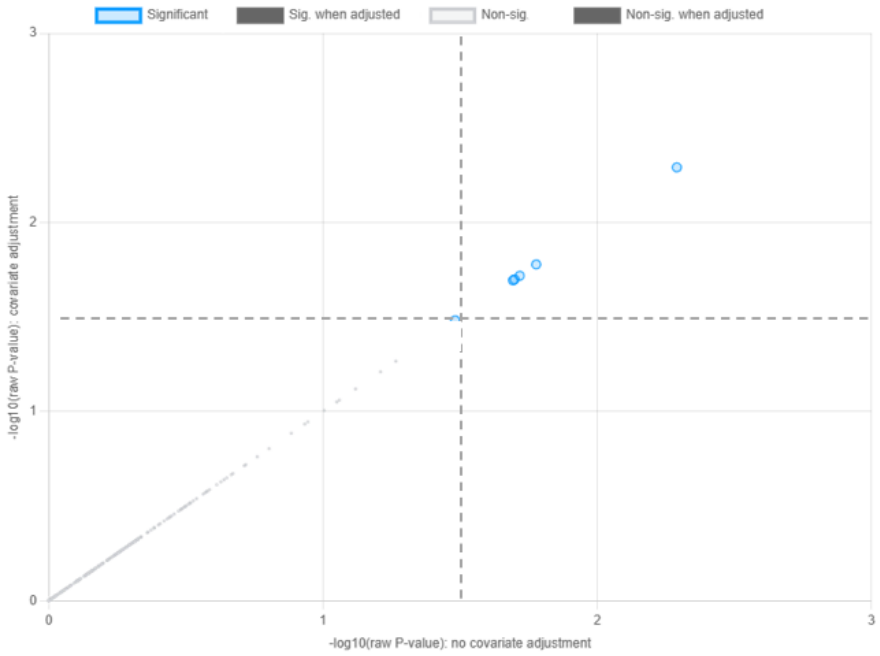
A tabela 3 representa os resultados na seleção dos metabólitos significante do grupo narguilé após utilização da plataforma metaboanalyst para cada variável clínica. Os gráficos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 representam as imagens geradas pelo metaboanalyst e editada para melhor entendimento do processo de análise e etapas de seleção dos metabólitos.

Gráfico 3 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Cotinina



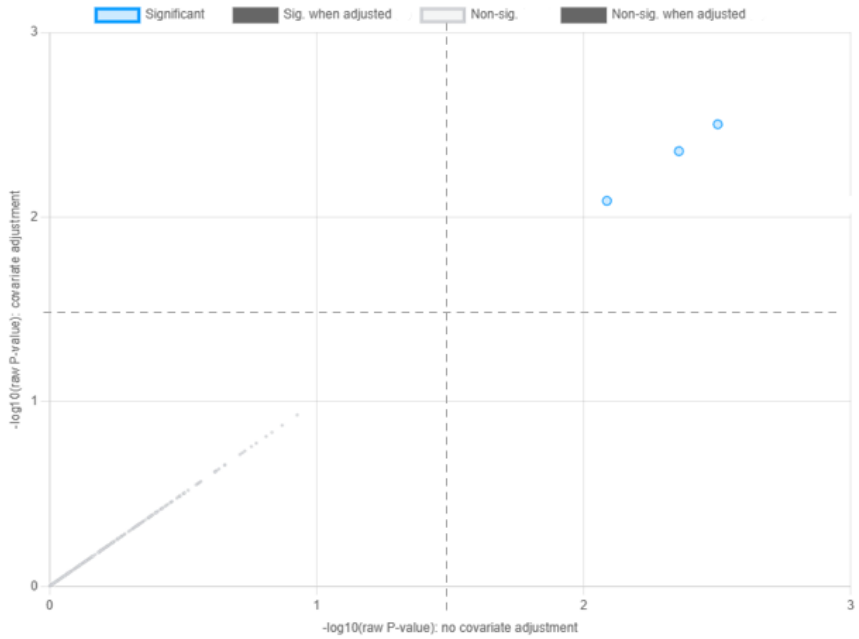
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 4 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica escore do risco relacionado ao álcool



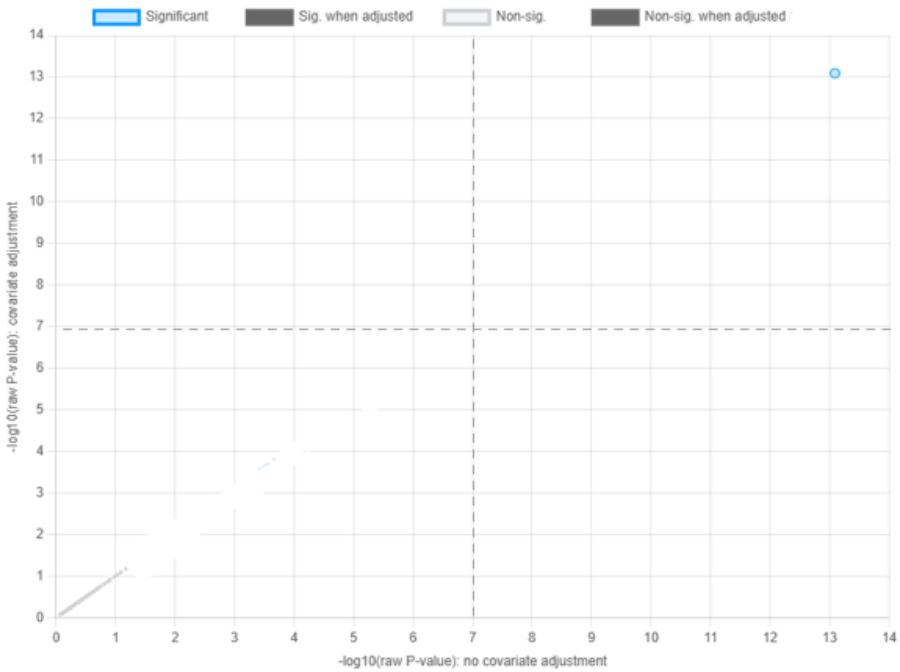
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 5 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Sessão



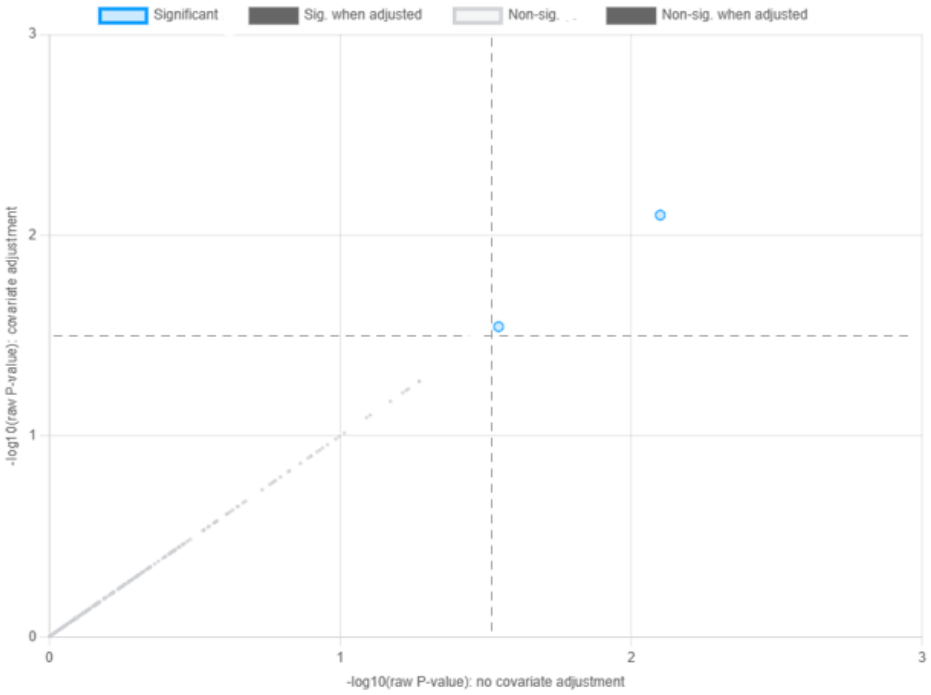
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 6 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Uso de álcool



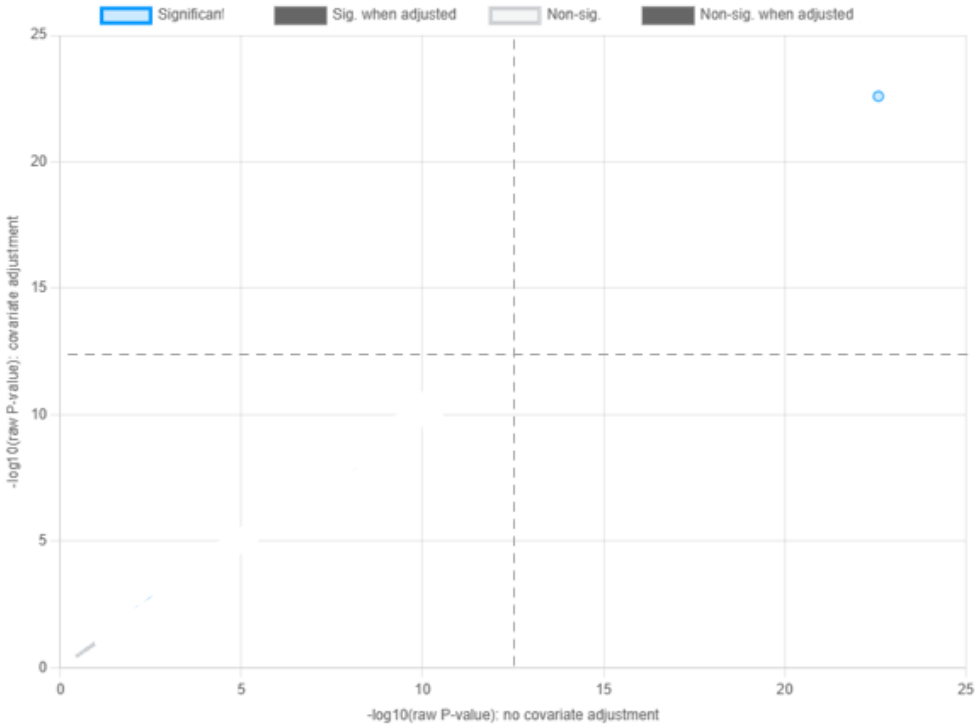
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 7 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Idade



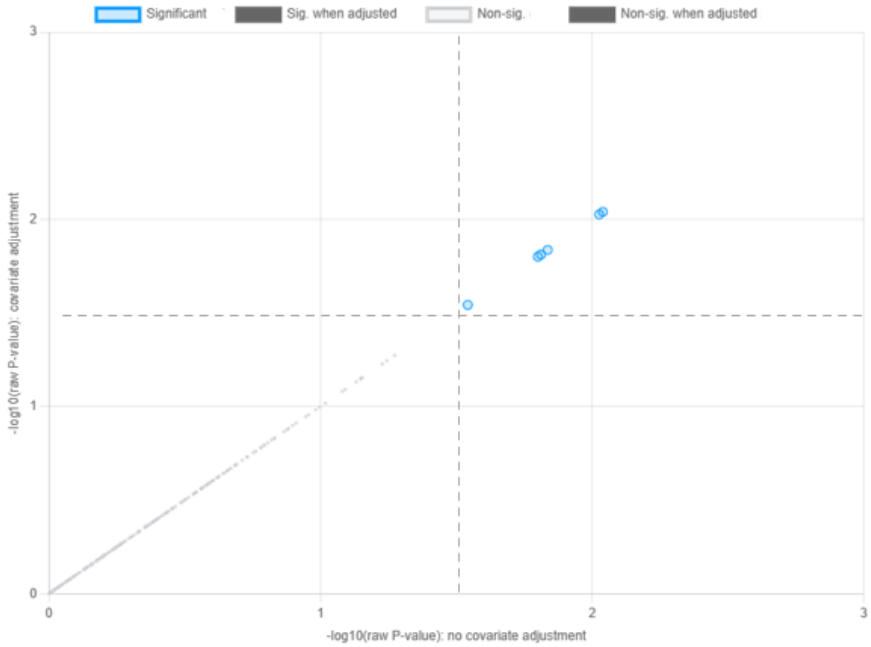
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 8 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Sexo



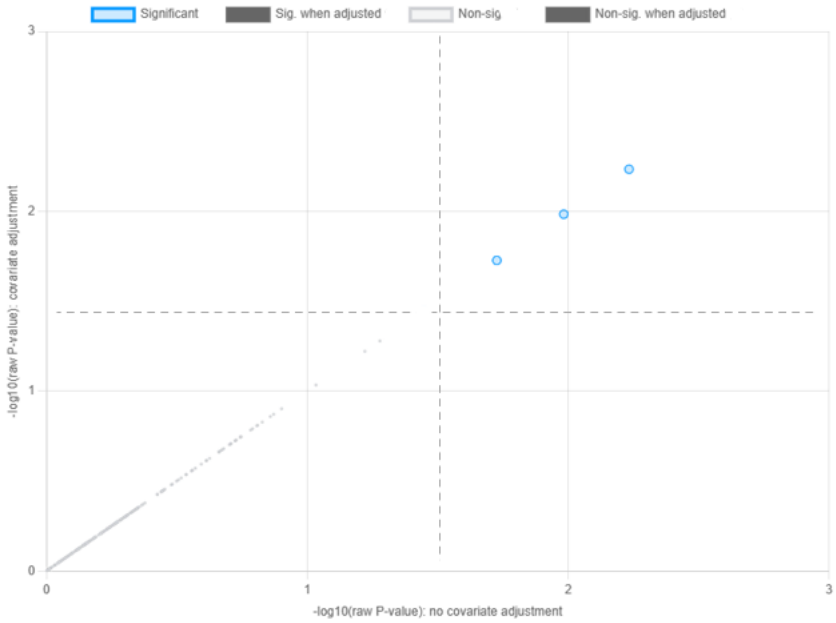
Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 9 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Tempo de consumo



Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Gráfico 10 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica dose de álcool



Fonte: Criada pelo Metaboanalyst e editada pelo Autor

Quadro 4 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé após utilização da plataforma Metaboanalyst 6.0 para cada variável clínica

VARIÁVEL	METABÓLITOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE
Idade	Ácido glutacônico, Ácido 4-hidroxifenilático
Sexo	Metionina sulfona
Tempo de consumo	Ácido 4-aminobutírico, Ácido 2-aminobutírico, Ácido 5-desidroquínico, Fucose, Ácido ureidopropiônico, Ácido urocânico
Sessões semanais	Ácido láctico, Citidina, Alose
Quantificação da cotinina salivar	Glicose, Sorbitol, Galactose, 4-hidroxiprolina, Inosina, Piridoxamina, Uracila, Prolina, Trietanolamina, Hidroquinona, Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, Adenosina, N6-acetilisina, Ácido glucônico, O-fosfoetanolamina, Ácido metopreno, Ácido3-hidroxiisovalérico
Uso de álcool	Metionina sulfona
Dose de álcool	Ácido capróico, Ácido 2-aminoisobutírico, O-fosfoetanolamina
Escore do risco relacionado ao álcool	Ácido capróico, Ácido glicólico, Ácido elaídico, Sarcosina, Ácido láctico

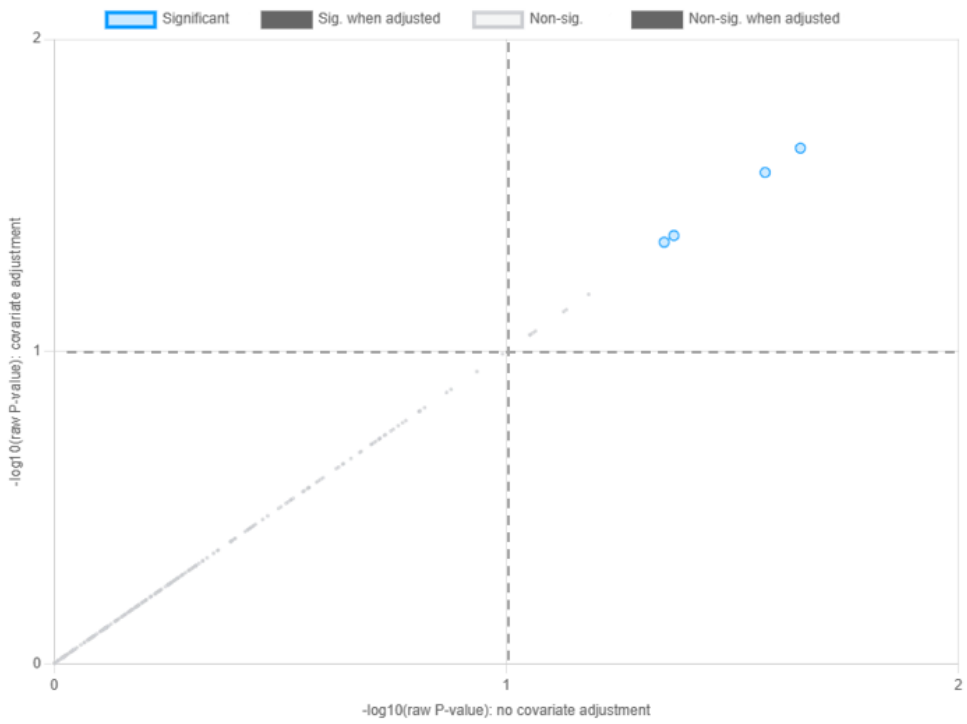
Fonte: Elaborado pelo Autor

4.5 Metabólitos do grupo cigarro

A tabela 4 representa um diagrama dos resultados na seleção dos metabólitos do grupo cigarro, onde a análise inicial foi constatada 339 metabólitos.

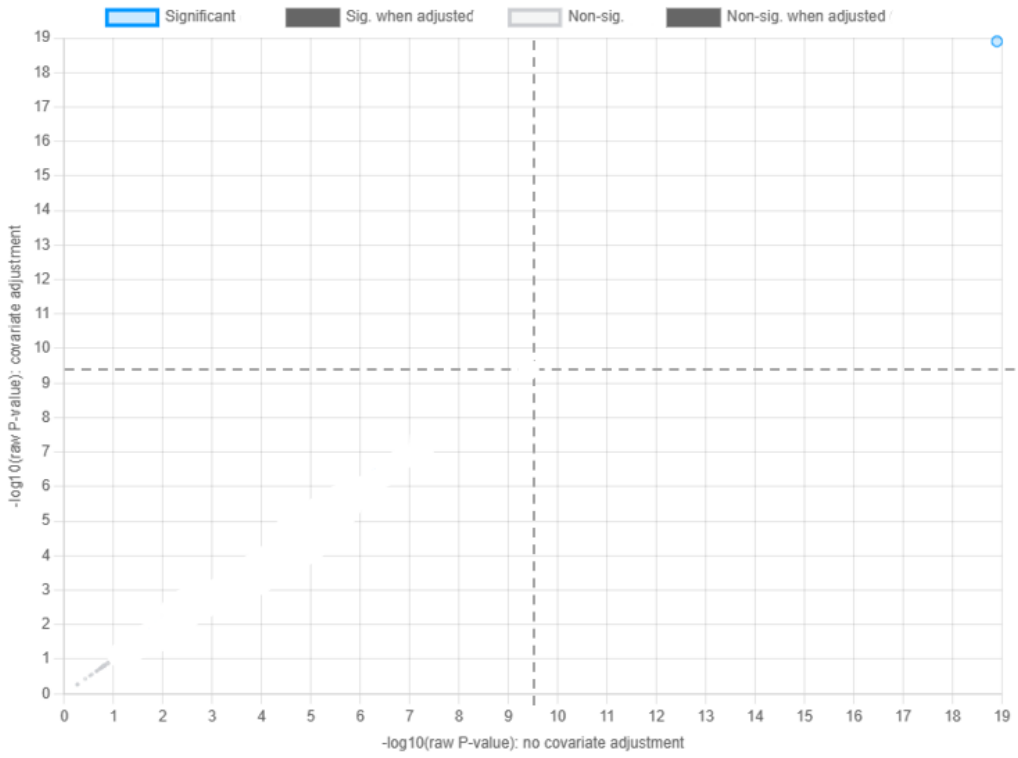
Os gráficos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 representam as imagens geradas pelo metaboanalyst e editada para melhor entendimento do processo de análise e etapas de seleção dos metabólitos.

Gráfico 11 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Idade



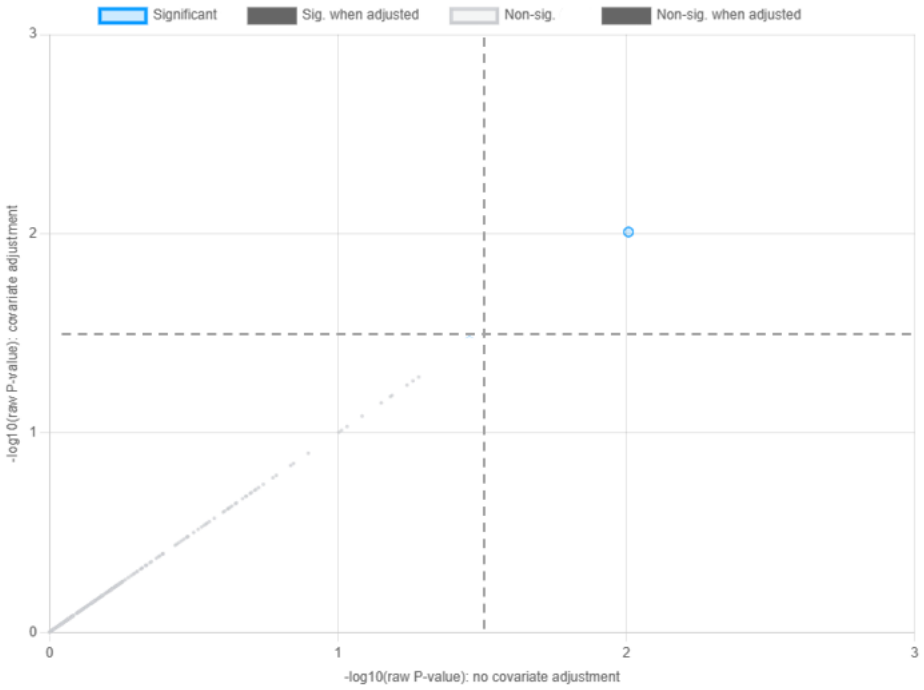
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 12 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para variável clínica Sexo



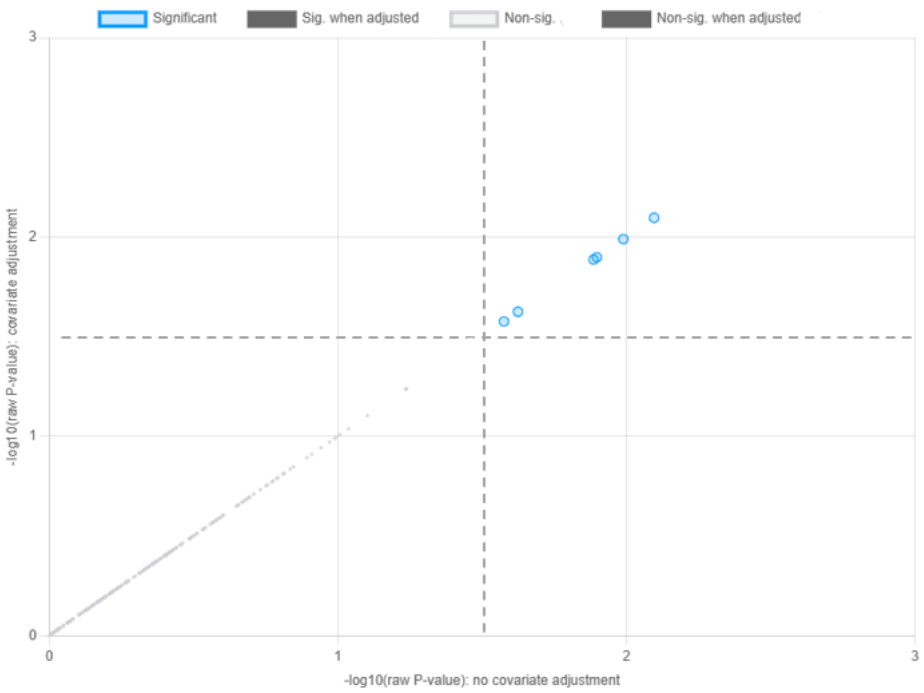
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 13 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Cigarro para variável clínica Tempo de consumo



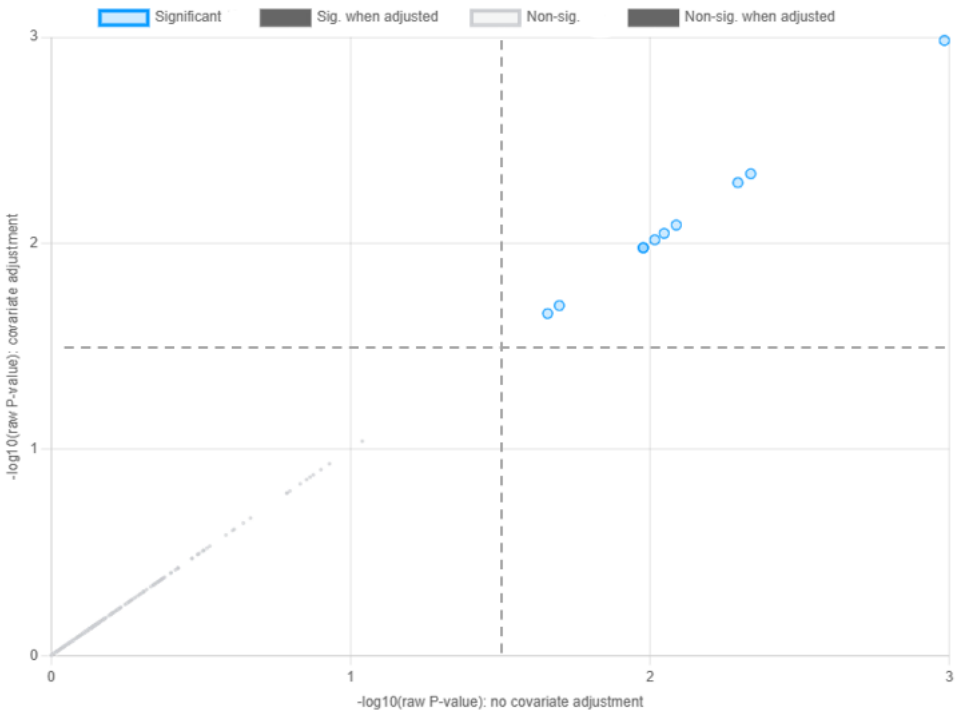
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 14 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Cigarro para variável clínica Sessões semanais



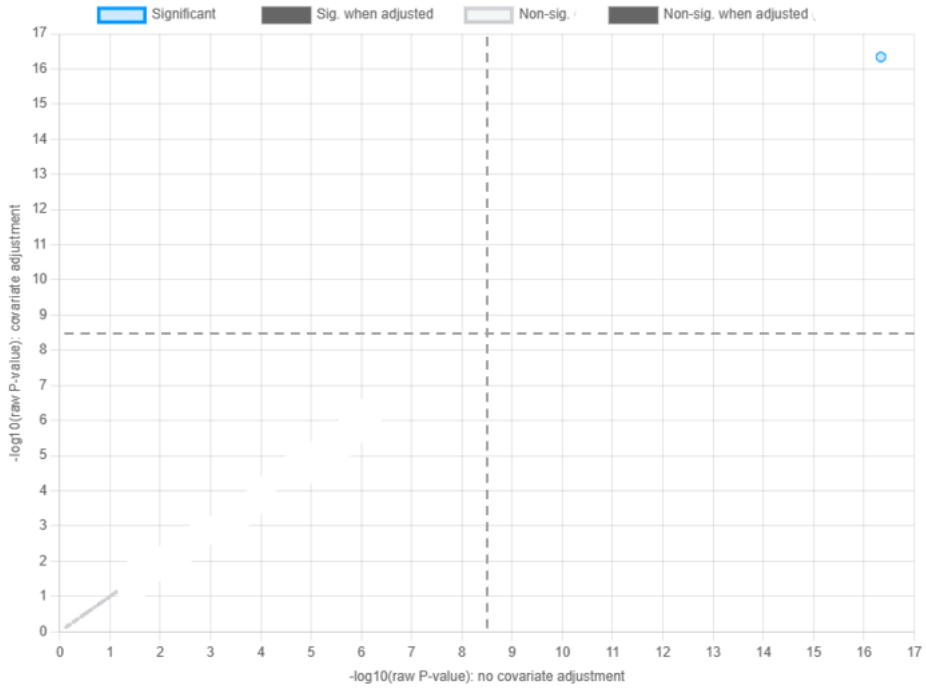
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 15 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Cigarro para variável clínica quantificação salivar da cotinina



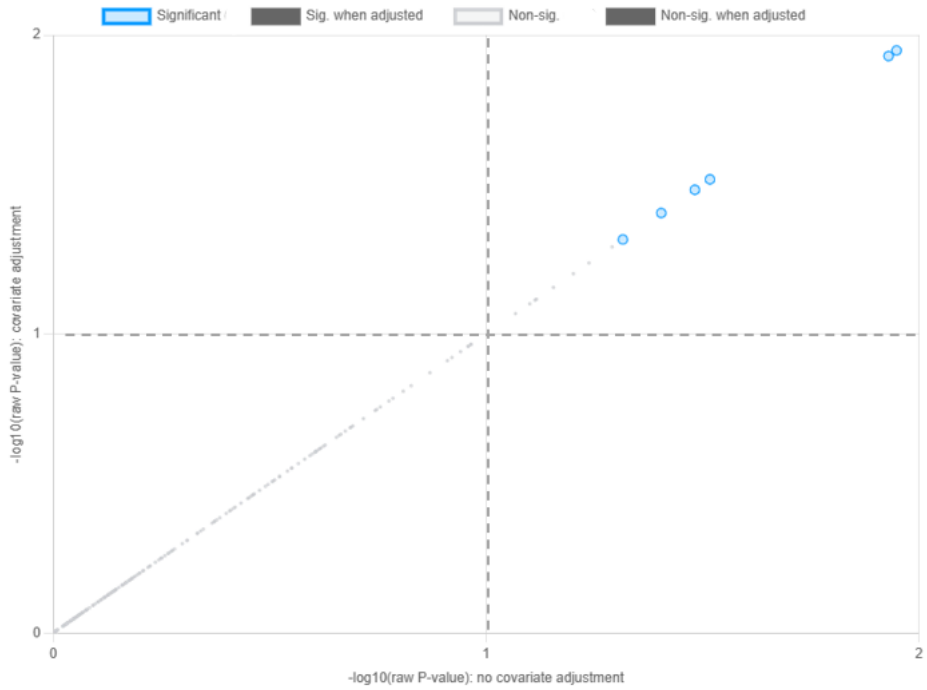
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 16 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Cigarro para variável clínica Uso de álcool



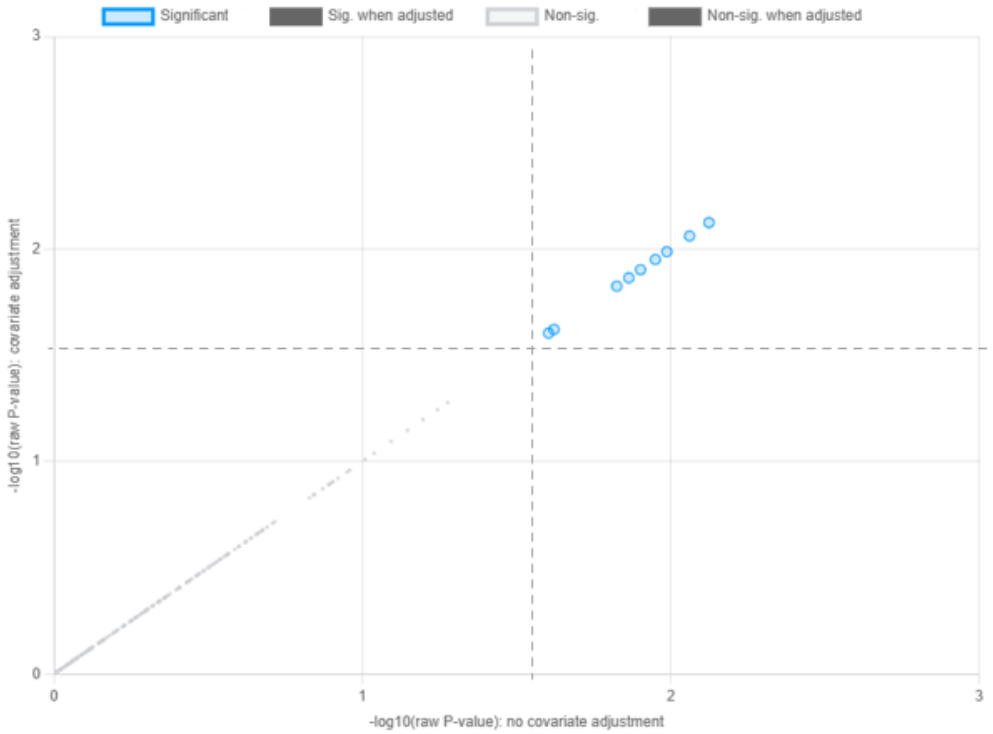
Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 17 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Cigarro para variável clínica dose de álcool



Fonte: Elaborado pelo Autor

Gráfico 18 - Resultados dos metabólitos significantes do grupo Narguilé para Cigarro clínica escore do risco relacionado ao álcool



Fonte: Elaborado pelo Autor

Quadro 5- Resultados dos metabólitos significantes do grupo cigarro convencional após utilização da plataforma Metaboanalyst 6.0 para cada variável clínica

VARIÁVEL	METABÓLITOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE
Idade	Gliceraldeído, Eritrulose, Ácido 2-hidroxiisocapróico, Leucina
Sexo	Metionina sulfona
Tempo de consumo	Leucina
Sessões semanais	Ácido 2-hidroxiisocapróico, N-Acetil-ornitina, Ácido 2-aminoisobutírico, Fosfato de Inositol, Ácido ribônico, Ácido pantotênico
Quantificação da conitina salivar	Ácido 2-aminoisobutírico, Ácido glutâmico, Alose, Triptofano, 5-Metoxitriptamina, Ácido glutaconico, Homocisteína, Epinefrina, Tirosina, Citidina
Uso de álcool	Metionina sulfona
Dose de álcool	Trealose, Ácido 4-aminobutírico, Ácido 2-isopropilmálico, Ácido isocítrico, Creatinina
Escore do risco relacionado ao álcool	Eritrulose, Ácido 6-fosfogluconico, Ácido linoleico, Arabitol, Galactitol, Ácido oleico, Ribitol, Ácido pantotênico, Uracila

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.6 Resultado da seleção dos metabólitos em ambos os grupos

Dentre os metabólitos significantes, foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão. Desta forma, a Tabela 05 destaca os oncometabólitos relevantes para o estudo, considerando os critérios estabelecidos na 3ª etapa.

Quadro 5- Resultados dos metabólitos significantes para cada variável clínica

GRUPO	METABÓLITO	DADO CLÍNICO
NARGUILÉ	Fucose	Tempo de consumo
NARGUILÉ	Ácido lático	Quantidade de sessões e Escore do risco relacionado ao álcool
NARGUILÉ	Prolina	Quantificação da cotinina salivar
NARGUILÉ	Sarcosina	Escore do risco relacionado ao álcool
CIGARRO CONVENCIONAL	Gliceraldeído	Idade

Fonte: Elaborado pelo Autor

5 DISCUSSÃO

Em estudo prévio o grupo, Greenfield *et al*., 2023, avaliou-se o metaboloma salivar de fumantes de narguilé e cigarros convencionais, demonstrando nesses resultados preliminares, diferenças entre os metabólitos e destacando alterações mais substanciais na saliva do usuário de narguilé[57]. No presente estudo, foi relacionado o perfil metabólico com dados clínicos e de consumo de tabaco. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avalia esta relação.

A cotinina o produto da metabolização da nicotina, é utilizada como biomarcador para utilização de tabaco, sendo útil para medir a exposição em fumantes ativos e passivos[58]. Quando avaliada a presença de nicotina na saliva, o índice não é semelhante a concentração encontrada no sangue, uma vez, que ela já foi parcialmente metabolizada[59]. Entretanto, a cotinina salivar é reflexo de sua concentração plasmática, apesar de algum grau de variação individual[60,61].

O estudo da saliva tem como vantagens ser tecnicamente simples e não invasivo, contendo cerca de 25% da cotinina a mais do que a coleta de sangue. Desta forma, a avaliação salivar apresenta-se como um método vantajoso para avaliação da cotinina[62].

O mecanismo analítico ELISA se diferencia por seu custo-benefício em relação a quantificação de cotinina. Contudo, em valores baixos pode haver dificuldades na mensuração. O método de espectrometria de massa associado a cromatografia líquida (LC-MS/MS) tem uma sensibilidade maior nos resultados, sendo mais preciso em concentrações baixas. Os dois métodos foram utilizados para avaliação das salivas de crianças expostas ambientalmente ao tabaco, e observaram que o método ELISA detectou 95% das amostras e LC-MS/MS detectou 97% das amostras, concluindo que o primeiro é uma alternativa econômica para a quantificação da cotinina[63].

O estudo ora em tela observou maior concentração de cotinina salivar em usuários de narguilé e ainda maior em usuários de cigarros convencionais comparados ao grupo controle. Bacha *et al*.,2007, tiveram resultados semelhantes, e avaliaram pacientes não fumantes, fumantes de narguilé, além de fumantes de cigarros, concluindo que a água do narguilé não filtra a nicotina e que o fumante controla a inalação da fumaça pela frequência e profundidade da inalação. Os autores destacaram que cotinina salivar pode ser uma boa ferramenta para detectar a

exposição ao fumo de narguilé. E ainda observaram que a quantidade de cotinina salivar foi inversamente afetada pelo intervalo de tempo do último narguilé e o número de pessoas com quem o compartilhava[64].

Nesse estudo não foi possível observar diferenças estatísticas na correlação da quantificação da cotinina e a idade. Entretanto, uma correlação estatisticamente relevante da quantificação da cotinina foi observada entre quantidade da cotinina e sexo dos pacientes, sendo maior em mulheres usuárias de narguilé. Mahabee-Gittens *et al*.,2020, demostrou que há uma concentração maior dos níveis de cotinina em indivíduos mais velhos e mulheres[63]. A diferença observada em relação ao sexo pode dever-se a uma maior capacidade de metabolização da nicotina no sexo feminino, havendo assim níveis mais altos de cotinina salivar[65]. Adicionalmente, em diferentes populações, observa-se diferenças na metabolização da nicotina, bem como nos padrões de tabagismo[65,66].

Não foi encontrado correlação estatisticamente relevante entre a quantificação da cotinina e o consumo de carcinógenos. Entretanto, Honarmand *et al.*,2018, concluiu em seu estudo que fatores como forma de fumar, tipo de cigarro, teor de nicotina e o tipo de método de medição podem afetar o nível de cotinina salivar, quando avaliado perfil metabólico de usuários de cigarro industrializado[67]. Seguindo o mesmo perfil de usuários, Swan *et al*.,1993, concluíram que a quantificação da cotinina era influenciada significativamente pela quantidade média de cigarros fumados nos 05 dias anteriores ao dia da coleta[68].

Assim como, Etter *et al*.,2000, que concluíram que a concentração de cotinina salivar estava associado a quantidade diária de cigarro fumado[69]. E Benowitz et al.,2004, que destacaram a idade como preditor para a concentração da cotinina salivar, tendo os grupos mais jovens menores concentrações e grupos mais velhos, concentrações mais elevadas[70].

Durante o desenvolvimento do trabalho, foi observado a correlação da quantificação do ácido lático salivar em relação com o risco relacionado ao álcool e a quantidade de sessões semanais de narguilé. Contudo, na literatura não foram encontrados estudos que realizaram essa associação.

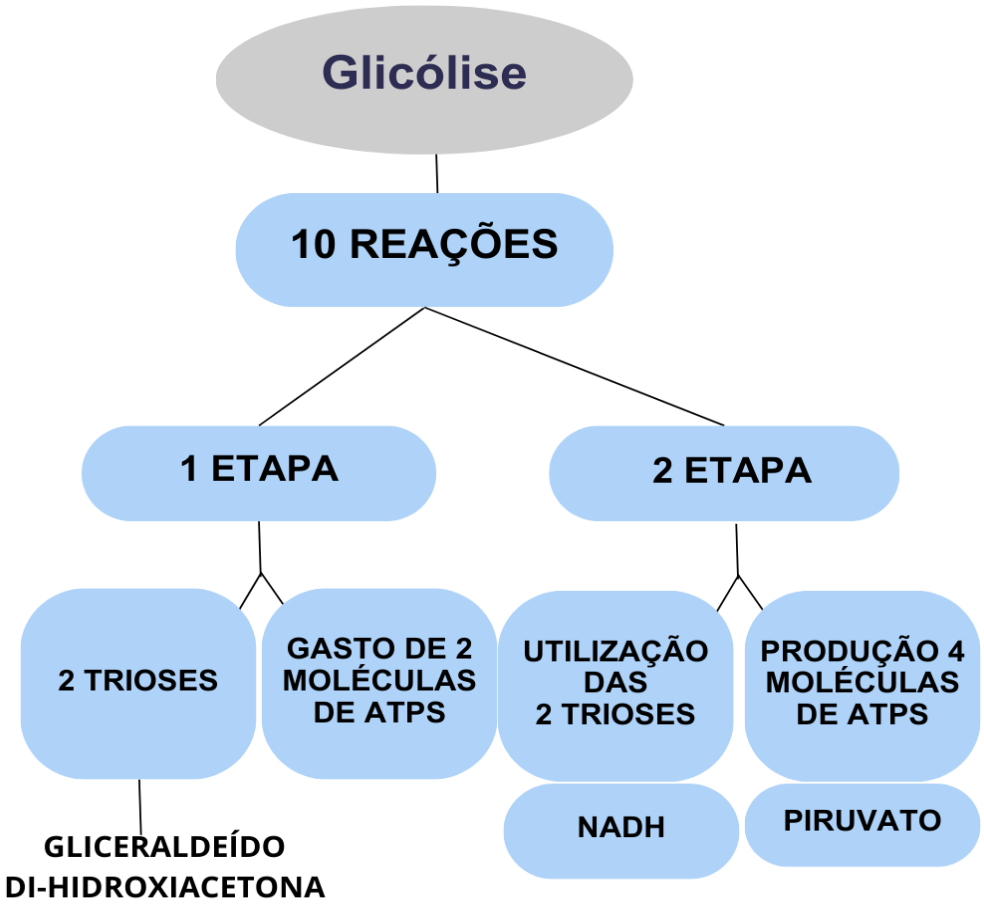
No sistema circulatório humano o metabólito ácido lático é considerado comum[71]. Contudo, sua presença propicia um ambiente favorável as células tumorais, potencializando a resistência ao estresse metabólico, resistência e disseminação

metastática. Contribuindo para formação de um sistema imunológico comprometido, favorecendo o crescimento tumoral[72].

O ácido lático é produto do processo da glicólise, transformando piruvato em lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Em um ambiente normal e na presença de oxigênio, o piruvato participa da produção de trifosfato de adenosina (ATP). Em situações em que há redução ou ausência de oxigênio, o piruvato é transformado em lactato[73].

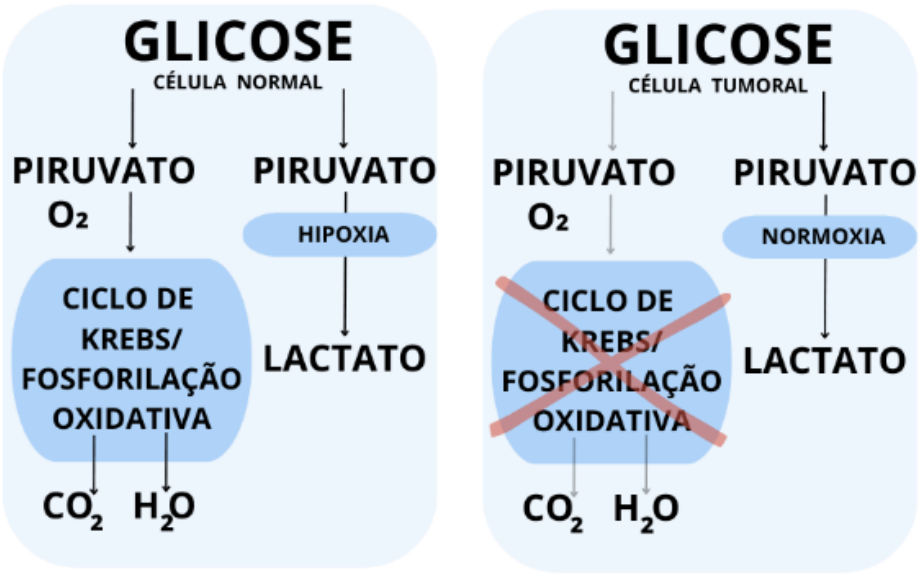
A figura 6 apresenta o processo de glicólise (via glicolítica), processo do qual a glicose é convertida em energia. Por sua vez, a figura 7 apresenta um fluxo sobre o metabolismo celular em células normais e na presença de células cancerígenas. Diferenciando o processo, na presença e ausência de oxigênio.

Figura 6 - Processo de glicólise (Via glicolítca)



Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 7 - Metabolismo celular da célula normal e célula tumoral (efeito Warburg)



Fonte: Elaborado pelo Autor

As concentrações sistêmicas do lactato são regulares, contudo, em situações como choque, sepse e câncer, há uma alteração na concentração. Nessa condição o ácido lático e lactato afetam a função celular. Em um meio com células tumorais, mesmo na presença de oxigênio o piruvato é transformado em lactato, essa situação foi denominada como efeito Warburg[74]. A figura 7 sumariza o processo descrito acima.

O estudo de pacientes com câncer cervical e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) que apresentaram concentrações maiores de lactato, desenvolveram uma alta disseminação metastática e tiveram uma sobrevida inferior ao grupo de pacientes com tumores de baixa concentração[75].

No trabalho de Sheng *et al*,2019, avaliou-se o tecido de melanoma metastático de 38 pacientes, observaram uma alta quantidade de LDHA, que codifica LDH, correlaciona com baixa quantidade CD3d do complexo do receptor de células T (TCR). Os autores concluíram, que a situação teve contribuição da produção de ácido lático na infiltração de células T[76].

Apostolova *et al*.,2022, concluiu que a elevada produção de ácido lático favorece as células tumorais, contribuindo para que resistam ao estresse metabólico, como a fase metastática. Além disso, as concentrações elevadas de ácido lático local favorecem o desenvolvimento e crescimento do tumor, por propiciarem um ambiente

imunológico favorável. As duas análises sobre os mecanismos de produção do ácido lático revelam correlação com a persistência e propagação das células tumorais[77].

Um estudo de infusão in vivo de [U-^{13}A C]-glicose em pacientes com tumor de pulmão de células não pequenas (NSCLC) submetidos à cirurgia revelou uma alta taxa de lactato proveniente de [U-^{13}A C]-glicose. Indicando a ocorrência da glicólise aeróbica, estando associada a progressão tumoral e ao desenvolvimento metastático durante os anos de acompanhamento clínico[78].

Segundo Alpaslan *et al*.,2020, o lactato participou de forma intermediária no ciclo do ácido cítrico em tecidos saudáveis, mas com um meio de células tumorais in vivo, foi primordial na geração de energia celular. Elevados níveis de lactato foram encontrados nos xenoenxertos de melanoma com alta capacidade metastática, em relação aos xenoenxertos de melanoma com baixa capacidade metastática[79].

No estudo Apostolova *et al*., 2022, a produção de ácido lático foi considerada um meio importante no mecanismo de escape das células malignas em relação ao sistema imunológico. Analisar a resistência aos tecidos tumorais ao meio ácido pode ser uma abordagem na imunoterapia contra o câncer[77].

A figura 8 sumariza os principais achados citados acima referente ao metabólito Ácido Lático.

Figura 8 – Alterações teciduais associadas ao ácido lático.



Fonte: Elaborado pelo Autor

O estudo ora em tela observou a correlação da quantidade da L-fucose salivar em relação com o risco relacionado ao tempo de consumo de narguilé em anos.

Contudo, na literatura não foram encontrados estudos que realizaram essa associação.

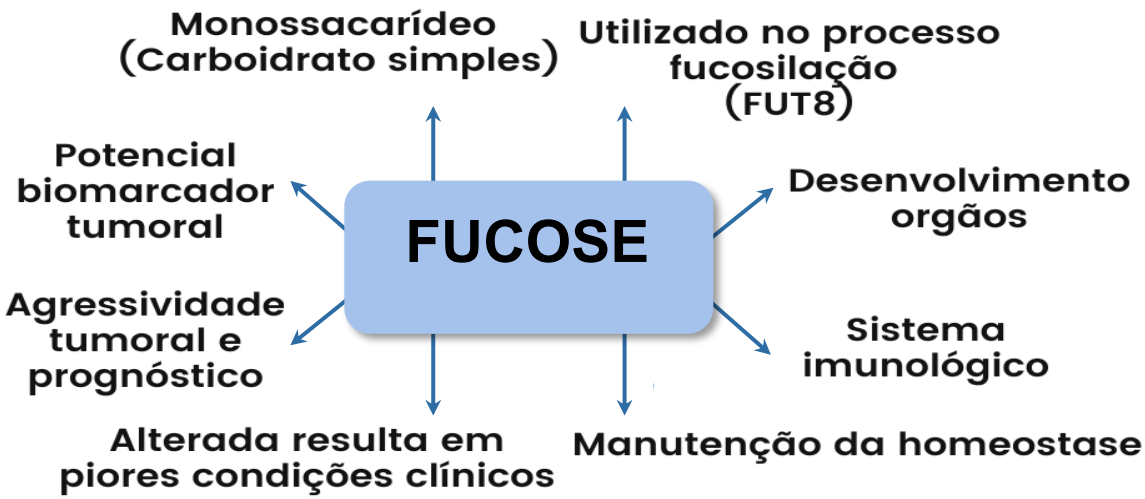
O metabólito L-fucose é um açúcar presente na dieta, que é utilizado pelas células no desenvolvimento da fucosilação, com produção de Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase (FUT8), regulando e modificando a função das proteínas subsequente a tradução, sendo importante para o desenvolvimento normal dos órgãos, funcionamento do sistema imunológico e no equilíbrio homeostático o processo de fucosilação[80].

Quando os níveis são baixos de FUT8, sua principal função na tumorigênese é representada com o bloqueio do crescimento tumoral e na diminuição da incidência metastática no câncer de mama, fígado, pulmão e melanoma[81].

As alterações na quantificação da FUT8 são diferentes em relação as categorias de tumores, estando relacionadas ao prognóstico dos pacientes e agressividade tumoral. No câncer, por exemplo, os níveis elevados de FUT8 são capazes de ocasionar alterações celulares que desencadeiam resultados clínicos não satisfatórios para os pacientes oncológico[83]. Desse modo, a FUT8 é reconhecida como um potencial biomarcador e um possível foco terapêutico em determinados tipos de câncer[50].

A figura 9 sumariza os principais achados citados acima referente ao metabólito Fucose.

Figura 9 - Alterações teciduais associadas ao fucose.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Neste trabalho, foi observado a correlação da quantificação salivar da prolina em relação â quantidade de consumo de tabaco no narguilé. Contudo, na literatura não foram encontrados estudos que realizaram essa associação.

O metabólito prolina é considerado um aminoácido e exerce função importante em relação ao crescimento tumoral[83]. No processo de apoptose, autofagia e senescência, a presença da prolina desidrogenase/ prolina oxidase (PRODH/POX) é estimulada pela proteína tumoral 53 (p53)[84].

Desta forma, o metabolismo desregulado do catabolismo da prolina desempenha papel no início e na progressão de neoplasias malignas, como o câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). O PRODH promove a tumorigênese do NSCLC induzindo a transformação de células epiteliais em células mesenquimal (EMT). A adição de prolina aumenta a quantidade de genes inflamatórios, bem como a EMT, proliferação e migração de células tumorais e crescimento tumoral[85].

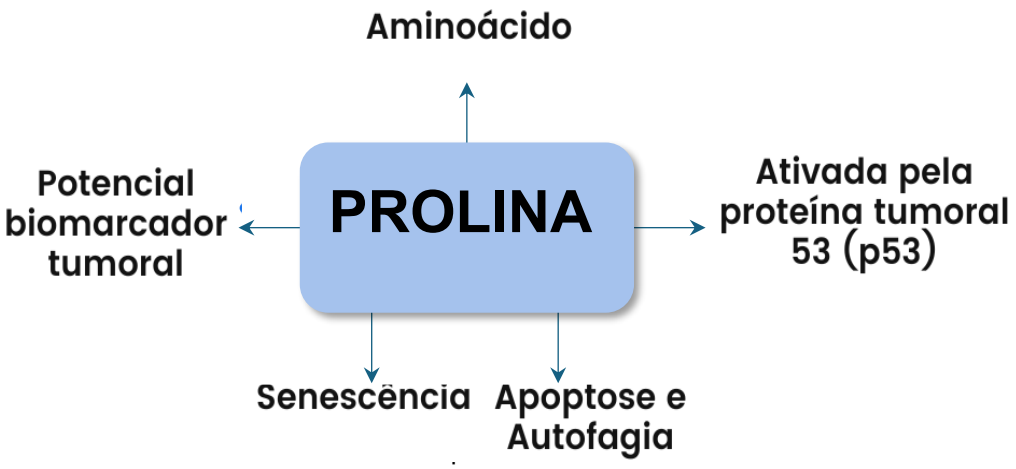
Estando os níveis de PRODH elevados em tecidos tumorais pulmonares, desempenhando um papel crucial no catabolismo da prolina[58]. Essas descobertas corroboram com os resultados dessa pesquisa sobre a importância do metabólito prolina, especialmente sua relação com o tabagismo e a progressão tumoral.

A prolina é identificada em níveis mais elevados em pacientes com câncer de pulmão[86], alinhando-se com os achados dessa pesquisa, em que se observou o aumento da quantidade de prolina salivar associado a maiores taxas salivares de cotinina em pacientes usuários de narguilé.

É importante destacar que há alteração no fornecimento de prolina e síntese de proteínas em tecidos com características malignas. Assim, identificar as vias metabólicas relacionadas a regulação da produção de prolina pode ser útil para o entendimento do desenvolvimento de uma neoplasia maligna. O que pode contribuir no desenvolvimento de novas estratégia terapêuticas pelo conhecimento do metabolismo tumoral[52].

A figura 10 sumariza os principais achados citados acima referente ao metabólito Prolina.

Figura 10 - Alterações teciduais associadas à prolina



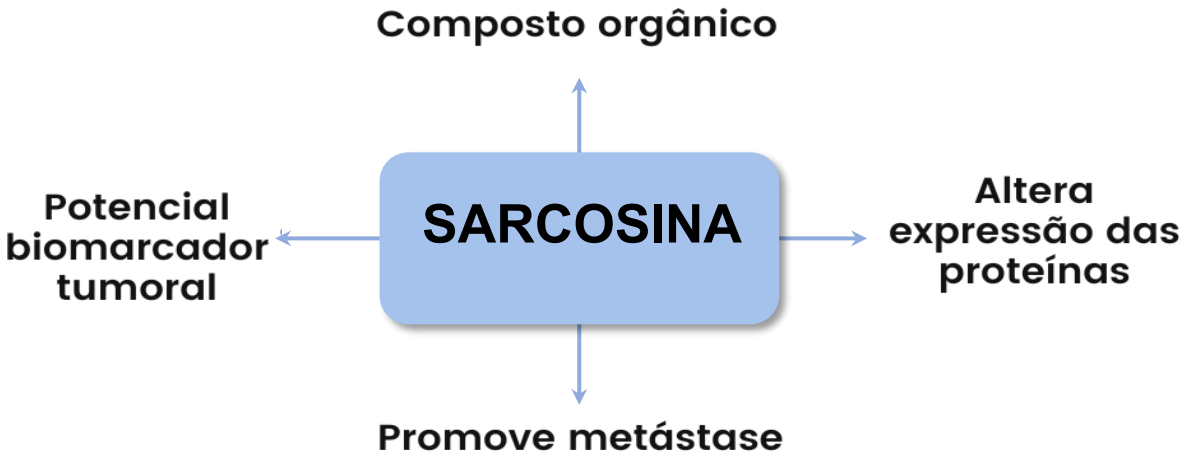
Fonte: Elaborado pelo Autor

No desenvolvimento do trabalho, foi observado a correlação da sarcosina salivar em relação com o risco relacionado ao consumo de álcool. Contudo, na literatura não foram encontrados estudos que realizaram essa associação.

O metabólito sarcosina desidrogenase (SARDH) é encontrado em níveis elevados nos tecidos benignos próximos aos tumores localizados e tecidos metastáticos. Sendo considerado um metabólito associado ao desenvolvimento de câncer, principalmente em lesões de próstata[87]. Esse metabólito desempenha um papel crucial no desenvolvimento da metástase ao estar associado ao aumento dos níveis da proteína TMEFF2 e níveis alterados da SARDH, que participam de eventos como crescimento ou invasão. Portanto, exerce papel na evolução do câncer, sendo apontado promissor biomarcador metastático celular[88], bem como no diagnóstico do neoplasias malignas, como o melanoma[89].

A figura 11 sumariza os principais achados citados acima referente ao metabólito Sarcosina.

Figura 11 - Alterações teciduais associadas sarcosina.



Fonte: Elaborado pelo Autor

Nesse trabalho, foi observado a correlação da quantificação do gliceraldeído em fumantes de cigarro. Contudo, na literatura não foram encontrados estudos que realizaram essa associação.

No meio celular, a glicose é convertida em energia pela via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). No caso das células tumorais, é utilizada a glicólise para geração de energia. Esse processo é menos eficiente na produção de ATP, e resulta na maior formação de lactato e piruvato. Células tumorais consomem glicose em maiores quantidades quando comparadas com células normais[90].

Segundo Akis et al, as atuais pesquisas para o tratamento do câncer têm sido focadas na inibição da glicólise. As terapias buscam o bloqueio de enzimas utilizadas nesse processo, como enzimas hexoquinase (HK) e fosfoglicose isomerase (GPI), presentes em células tumorais[91].

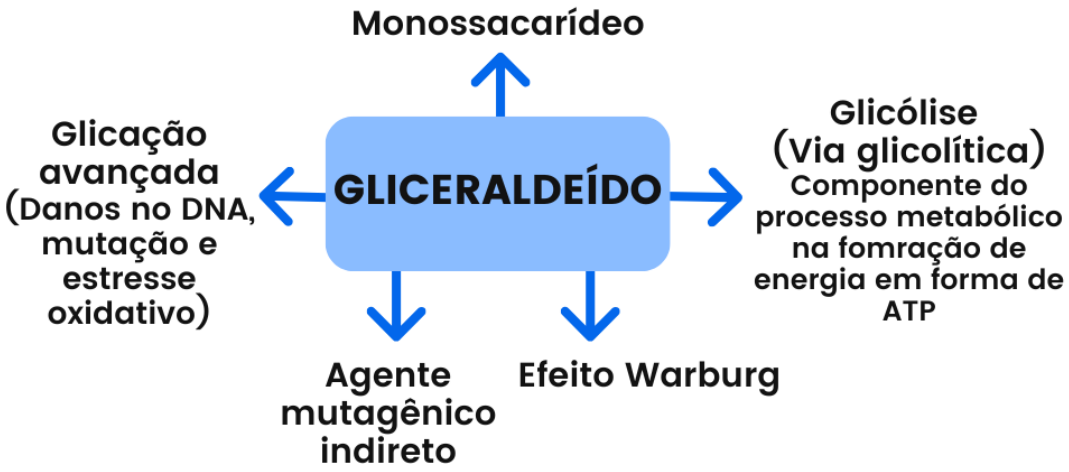
O lactato produzido durante a glicólise contribui para que as células tumorais driblem o sistema imunológico. Criando um ambiente ácido extracelular, que atua nas proteases que degradam a matriz extracelular, inibem as células T, favorecendo a proliferação e desenvolvimento do tumor[92].

A enzima glicolítica Triose-fosfato isomerase (TPI) é considerada um alvo terapêutico para pesquisas de tratamento oncológico. Além de ser um biomarcador associado a tumores, resistência medicamentosa e a drogas associadas a quimioterapia[93]. A TPI está associada ao prognóstico de uma variedade de células tumorais, incluindo células cancerígenas cerebrais, mamárias, cólon, gástricas,

renais, linfonodos, próstata, renais, testículos e urinárias com potenciais metastáticos[94].

A figura 12 sumariza os principais achados citados acima referente ao metabólito Gliceraldeído.

Figura 12 - Alterações teciduais associadas ao gliceraldeído.



Fonte: Elaborado pelo Autor

6 CONCLUSÃO

O estudo enfrentou algumas limitações e desafios em sua condução. No entanto, apesar desses obstáculos, as análises demonstraram uma relação entre metabólitos salivares, dados clínicos e o consumo de tabaco. Nos usuários de narguilé, foram identificados quatro oncometabólitos relevantes: ácido lático, sarcosina, prolina e fucose. Estando o ácido lático relacionado ao risco de consumo de álcool e a quantidade de sessões semanais; a sarcosina relacionada ao risco de consumo de álcool, a prolina relacionada com a quantidade de tabaco e a fucose relacionada ao tempo de consumo de narguilé. Já nos usuários de cigarro, o metabólito gliceraldeído, foi considerado significante, correlacionando-se com a idade. No entanto, ainda são necessários novos estudos para explorar mais profundamente a relação entre os dados clínicos e os metabólitos, com o objetivo de contribuir para a padronização de oncometabólitos e condições clínicas associadas a fumantes de cigarro convencional e de narguilé. Isso permitirá maior confiabilidade no uso de biomarcadores salivares para o diagnóstico precoce de carcinoma de células escamosas em tabagistas. Portanto, as análises reforçam a existência de correlações específicas entre dados clínicos e metabólicos em determinados pacientes, destacando a importância de ampliar as investigações nessa área.

REFERÊNCIAS

1. Weber DD, Zaganjor E, Sun Q, Egnatchik RA, Holohan B, Hamity MV, et al. WHO reports progress in the fight against tobacco epidemic [Internet]. Cancers. 2021 Julho. [Acesso em: 30 de Abril de 2023];13(3):434. Disponível em:https://www.who.int/news/item/27-07-2021-who-reports-progress-in-the-fight-against-tobacco-epidemic.

2. Pinto M, Bardach A, Palacios A, Biz AN, Alcaraz A, Rodríguez B, Augustovski F, Pichon-Riviere. A Carga da doença e econômica atribuível ao tabagismo no Brasil e potencial impacto do aumento de preços por meio de impostos [Internet]. Documento técnico IECS N°21. Buenos Aires: Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria; 2024 [acesso em 15 Set 2024]. Disponível em: www.iecs.org.ar/tabaco.

3. Ribeiro M, Cruz RC. Jovens e o uso do narguilé: a saúde pode ser comprometida?. Editorial. Paraná: ASSOBRAFIR Ciênc., 2016;7(1):7-10 [Acesso em 30 de Abril]. Disponível em: http://www.assobrafir.periodikos.com.br/article/5dd53f630e8825fa43c8fca7/pdf/1571231544-7-1-7.pdf

4. Patil S, Subbannayya T, Mohan SV, Babu N, Advani J, Sathe G, Rajagopalan P, Patel K, Bhandi S, Solanki H, Sidransky D, Gowda H, Chatterjee A, Ferrari M. Proteomic Changes in Oral Keratinocytes Chronically Exposed to Shisha (Water Pipe). OMICS [Internet] 2019 Fevereiro [acesso em 15 Setembro 2024]; 23(2):86-97. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30767727/. doi: 10.1089/omi.2018.0173. PubMed PMID: 30767727.

5. Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, Peto R, Zatonski W, Hsia J, Morton J, Palipudi KM, Asma S. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys [Internet]. 2012 Agosto. [Acesso em: 15 de Setembro de 2024];18;380(9842):668-79. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22901888/. Doi: 10.1016/S0140-6736(12)61085-X. PMID: 22901888.

6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saúde do escolar: 2019. Rio de Janeiro: IBGE; 2021. 162 páginas.

7. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Oral squamous cell carcinoma: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment [Internet]. [Acesso em: 30 de Abril de 2023]; 2007;53(1):63-69. Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/237680337_Carcinoma_de_celulas_escamosas_bucal_uma_revisao_de_literatura_entre_o_perfil_do_paciente_estadiamento_clinico_e_tratamento. doi:10.32635/2176-9745.

8. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2011 [Acesso em: 20 de Maio de 2023];Aug;23(8):633-41. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21654320/. doi: 10.1097/MEG.0b013e3283484795. PMID: 21654320.

9. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: 2023. 160 p.

10. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res [Internet] 1996 Junho [Acesso em 20 de Maio de 2023];56(11):2488-92.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8653682/.PMID: 8653682.

11. Bakhtiari S, Azimi S, Mehdipour M, Amini S, Elmi Z, Namazi Z. Effect of Cigarette Smoke on Salivary Total Antioxidant Capacity. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects [Internet] 2015 Dezembro [Acesso em 30 de Maio de 2023];9(4):281-4. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26889367/. doi: 10.15171/joddd.2015.049. PMID: 26889367; PMCID: PMC4753039.

12. Arbabi-Kalati F, Salimi S, Vaziry-Rabiee A, Noraeei M. Effect of mobile phone usage time on total antioxidant capacity of saliva and salivary immunoglobulin a. Iran J Public Health [Internet]. 2014 Abril [Acesso em 30 de Maio de 2023] 43(4):480-4. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26005658/. PMID: 26005658; PMCID: PMC4433729.

13. Nosratzehi T. Salivary Chemical Factors in Relation with Oral Cancer in Smokers and Non-Smokers: a Literature Review. J Dent [Internet]. 2017 Dezembro [Acesso em 30 de Maio de 2023];18(4):237-243. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29201965/. PMID: 29201965; PMCID: PMC5702426.

14. Greabu M, Totan A, Battino M, Mohora M, Didilescu A, Totan C, Spinu T. Cigarette smoke effect on total salivary antioxidant capacity, salivary glutathione peroxidase and gamma-glutamyltransferase activity. Biofactors [Internet]. 2008 2008;33(2):129-36. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346588/. doi: 10.1002/biof.5520330205. PMID: 19346588.

15. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. Oral Oncol [Internet]. 2008 Abril;44(4):354-60. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18381248/. doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.002. PMID: 17936677.

16. Leite RB, Lima RS, Aguiar AS, Lopes FF, Batista AC. The influence of tobacco and alcohol in oral cancer: literature review. J Bras Patol Med Lab [Internet]. 2021; 57:114. Disponível em: https://www.scielo.br/j/jbpml/a/89C6bN8stqdQZWPCjj96Ghf/. https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210001

17. Glantz SA, Bareham DW. E-Cigarettes: Use, Effects on Smoking, Risks, and Policy Implications. Annu Rev Public Health [Internet]. 2018 Abril; 1;39:215-235. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29323609/. doi: 10.1146/annurev-publhealth-040617-013757.

18. Organization World Health Organization. Who report on the global tobacco epidemic, 2023: protect people from tobacco smoke. Geneva; 2023. 216 p.

19. Bernat D, Gasquet N, Wilson KO, Porter L, Choi K. Electronic Cigarette Harm and Benefit Perceptions and Use Among Youth. Am J Prev Med [Internet]. 2018 Setembro [acesso em 15 de junho de 2023];55(3):361-367.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30031636/ doi:10.1016/j.amepre.2018.04.043. PMID: 30031636; PMCID: PMC6168072.

20. Barrington-Trimis JL, Leventhal AM. Adolescents' Use of "Pod Mod" E-Cigarettes - Urgent Concerns. N Engl J Med. 2018 Setembro [acesso em 15 de julho de 2023]20;379(12):1099-1102. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134127/. doi: 10.1056/NEJMp1805758. PMID: 30134127..

21. Bertoni N, Cavalcante TM, Souza MC, Szklo AS. Prevalence of electronic nicotine delivery systems and waterpipe use in Brazil: where are we going? Rev Bras Epidemiol. 2021 Dezembro [acesso em 30 de Setembro de 2023]10;24(suppl 2):e210007.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34910061/ doi: 10.1590/1980-549720210007.supl.2. PMID: 34910061.

22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar: 2015. Rio de Janeiro, RJ; 2016. 126p.

23. Stanton CA, Bansal-Travers M, Johnson AL, Sharma E, Katz L, Ambrose BK, Silveira ML, Day H, Sargent J, Borek N, Compton WM, Johnson SE, Kimmel HL, Kaufman AR, Limpert J, Abrams D, Cummings KM, Goniewicz ML, Tanski S, Travers MJ, Hyland AJ, Pearson JL. Longitudinal e-Cigarette and Cigarette Use Among US Youth in the PATH Study (2013-2015). J Natl Cancer Inst. 2019 Outubro [acesso em 30 de setembro de 2023]1;111(10):1088-1096. Disponível em: https://nyuscholars.nyu.edu/en/publications/longitudinal-e-cigarette-and-cigarette-use-among-us-youth-in-the-. doi: 10.1093/jnci/djz006. PMID: 30689915.

24. Martins SR, Santos UP. Waterpipe smoking, a form of tobacco consumption that is on the rise. J Bras Pneumol. 2019 Outubro [acesso em 15 de Outubro de 2023]10;45(5):e20190315. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31618292/. doi: 10.1590/1806-3713/e20190315. PMID: 31618292; PMCID: PMC7247768.

25. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. Nota técnica: uso de narguilé: efeitos sobre a saúde, necessidades de pesquisa e ações recomendadas para legisladores. Rio de Janeiro, 2017. 2ªed. 49p.

26. Amer HW, Waguih HM, El-Rouby DH. Development of field cancerization in the clinically normal oral mucosa of shisha smokers. Int J Dent Hyg. 2019 Fevereiro [acesso em 30 de novembro de 2023];17(1):39-45.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30113759/. doi: 10.1111/idh.12362.PMID: 30113759.

27. Mamtani R, Cheema S, Sheikh J, Al Mulla A, Lowenfels A, Maisonneuve P. Cancer risk in waterpipe smokers: a meta-analysis. Int J Public Health. 2017 Janeiro [acesso em 20 de Janeiro de 2024];62(1):73-83. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27421466/. doi: 10.1007/s00038-016-0856-2. PMID: 27421466.

28. Khemiss M, Ben Khelifa M, Ben Saad H. Preliminary findings on the correlation of saliva pH, buffering capacity, flow rate and consistency in relation to waterpipe tobacco smoking. Libyan J Med. 2017 Dezembro;12(1):1289651.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28266252/. doi: 10.1080/19932820.2017.1289651. PMID: 28266252.

29. Derici Eker E, Koyuncu H, Şahin NÖ, Yüksel A, Berköz M, Budak Diler S, Altan Akgül S. Determination of Genotoxic Effects of Hookah Smoking by Micronucleus and Chromosome Aberration Methods. Med Sci Monit. 2016 Novembro [acesso em 20 de Janeiro de 2024]21;22:4490-4494. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27869111/. doi: 10.12659/msm.898593. PMID: 27869111; PMCID: PMC5120646.

30. Sabi SH, Khabour OF, Alzoubi KH, Cobb CO, Eissenberg T. Changes at global and site-specific DNA methylation of *MLH1* gene promoter induced by waterpipe smoking in blood lymphocytes and oral epithelial cells. Inhal Toxicol [Internet]. 2020 Fevereiro [acesso em 20 de Janeiro 2024];32(3):124-130. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8006073/. doi: 10.1080/08958378.2020.1754972. PMID: 32319830.

31. Mandel ID. The functions of saliva. J Dent Res [Internet]. 1987 Fevereiro [acesso em 10 de Fevereiro de 2024];66 Spec No:623-7 Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3497964/. doi: 10.1177/00220345870660S203. PMID: 3497964.

32. Jenifer HD, Bhola S, Kalburgi V, Warad S, Kokatnur VM. The influence of cigarette smoking on blood and salivary super oxide dismutase enzyme levels among smokers and nonsmokers-A cross sectional study. J Tradit Complement Med [Internet]. 2015 Janeiro [acesso em 20 de Janeiro]; 9;5(2):100-5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151019/. doi: 10.1016/j.jtcme.2014.11.003. PMID: 26151019.

33. Ghazi A, Pakfetrat A, Hashemy SI, Boroomand F, Javan-Rashid A. Evaluation of Antioxidant Capacity and Cotinine Levels of Saliva in Male Smokers and Non-smokers. Addict Health [Internet]. 2020 Outubro [acesso em 10 de Janeiro];12(4):244-250. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7878005/. doi: 10.22122/ahj.v12i4.278. PMID: 33623643.

34. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies. Geneva, 2017. 135p.

35. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in risk assessment: validity and validation. Geneva, 2001.222p.

36. Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. Diagnostics (Basel). 2017 Janeiro [acesso em 10 de Fevereiro de 2024]20;7(1):7. Disponível em; https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28117682/. doi: 10.3390/diagnostics7010007. PMID: 28117682.

37. Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. Appl Biochem Biotechnol. 2012 Novembro [acesso em 20 de Fevereiro de 2024];168(6):1718-27. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22971835/.doi: 10.1007/s12010-012-9891-5.

38. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. Med Oncol. 2017 Janeiro [acesso em 17 de Março de 2024];34(1):7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27943101/. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4. PMID: 27943101.

39. Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. Orthod Craniofac Res. 2009 Agosto [acesso em 17 de Março de 2024];12(3):206-11.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19627522/. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x. PMID: 19627522.

40. Figueiredo VC, Szklo M, Szklo AS, Benowitz N, Lozana JA, Casado L, Masson E, Samet J. Determinantes do nível de cotinina salivar: um estudo de base populacional no Brasil. Rev Saude Publica. Dezembro de 2007; 41(6):954-62. Disponível em: https://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/32336. DOI: 10.1590/S0034-89102006005000048. PMID: 17992352.

41. Benowitz NL, Jacob P 3rd. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. Clin Pharmacol Ther. 1994 Novembro;56(5):483-93. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7955812/. doi: 10.1038/clpt.1994.169. PMID: 7955812.

42. De Biasi M, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. Annu Rev Neurosci. 2011 [acesso em 25 Maio de 2024];34:105-30. Disponível em; https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21438686/. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113734. PMID: 21438686.

43. Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. Pharmacol Rev. 2005 Março [acesso em 30 de Maio de 2024];57(1):79-115. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15734728/. doi: 10.1124/pr.57.1.3. PMID: 15734728.

44. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. Epidemiol Rev. 1996 [acesso em 30 de Maio de 2024];18(2):188-204.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9021312/. doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a017925. PMID: 9021312.

45. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. Sci Rep. 2014 Outubro [acesso

em 30 de Maio de 2024]30;4:6802. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25354816/. doi: 10.1038/srep06802. PMID: 25354816.

46. Toraño JS, van Kan HJ. Determinação simultânea dos parâmetros de absorção da fumaça do tabaco nicotina, cotinina e tiocianato na urina, saliva e cabelo, usando cromatografia gasosa espectrometria de massa para caracterização do estado de tabagismo de indivíduos recentemente expostos. Analyst 2003 [acesso em 10 de junho de 2024];128:838-43. Disponível em: https://www.scielo.br/j/qn/a/DMHRNdtd7bRXhTgPGwzdKjM/. Doi:10.1039/b304051h.

47. Cacciatore S, Loda M. Innovation in metabolomics to improve personalized healthcare. Ann N Y Acad Sci. 2015 Jun;1346(1):57-62. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26014591/. doi: 10.1111/nyas.12775. PMID: 26014591.

48. Canuto GAB, Costa JL da, Cruz PLR da, Souza ARL de, Faccio AT, Klassen A, Rodrigues KT, Tavares MFM. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. Química Nova. 2018 [acesso em 10 de junho de 2024]; 41(1): 75-91. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134.

49. Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol. 2002 Janeiro [acesso em 10 de junho de 2024];48(1-2):155-71. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11860207/. PMID: 11860207.

50. Wang YP, Li JT, Qu J, Yin M, Lei QY. Metabolite sensing and signaling in cancer. J Biol Chem. 2020 Agosto [acesso em 10 de junho de 2024]14;295(33):11938-11946. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32641495/. doi: 10.1074/jbc.REV119.007624. PMID: 32641495..

51. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. Cancer Cell. 2018 Agosto [acesso em 10 de junho de 2024]13;34(2):186-195. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29805076/. doi: 10.1016/j.ccell.2018.04.011. PMID: 29805076.

52. Navazesh M, Kumar SK; University of Southern California School of Dentistry. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. J Am Dent Assoc. 2008 Maio [acesso em 20 de julho de 2024];139 Suppl:35S-40S. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18460678/. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0353. PMID: 18460678.

53. Garcia-Perez I, Lindon JC, Minet E. Application of CE-MS to a metabonomics study of human urine from cigarette smokers and non-smokers. Bioanalysis. 2014 Outubro [acesso em 20 de junho de 2024];6(20):2733-49. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25413705/. doi: 10.4155/bio.14.136. PMID: 25413705.

54. Jones DP, Walker DI, Uppal K, Rohrbeck P, Mallon CT, Go YM. Metabolic Pathways and Networks Associated With Tobacco Use in Military Personnel. J Occup Environ Med. 2016 Agosto [acesso em 20 de julho de 2024];58(8 Suppl

1):S111-6. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4978145/. doi: 10.1097/JOM.0000000000000763. PMID: 27501098.

55. Hsu PC, Lan RS, Brasky TM, Marian C, Cheema AK, Ressom HW, Loffredo CA, Pickworth WB, Shields PG. Metabolomic profiles of current cigarette smokers. Mol Carcinog. 2017 Fevereiro [acesso em 30 de julho de 2024];56(2):594-606.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27341184/. doi: 10.1002/mc.22519. PMID: 27341184.

56. de Sá Alves M, de Sá Rodrigues N, Bandeira CM, Chagas JFS, Pascoal MBN, Nepomuceno GLJT, da Silva Martinho H, Alves MGO, Mendes MA, Dias M, Alves LAC, Almeida JD. Identification of Possible Salivary Metabolic Biomarkers and Altered Metabolic Pathways in South American Patients Diagnosed with Oral Squamous Cell Carcinoma. Metabolites. 2021 Setembro [acesso em 30 de julho de 2024];23;11(10):650. Disponível em: https://www.mdpi.com/2218-1989/11/10/650. doi: 10.3390/metabo11100650. PMID: 34677365.

57. Greenfield E, Alves MS, Rodrigues F, Nogueira JO, da Silva LF, de Jesus HP, Cavalcanti DR, Carvalho BFDC, Almeida JD, Mendes MA, Oliveira Alves MG. Preliminary Findings on the Salivary Metabolome of Hookah and Cigarette Smokers. ACS Omega. 2023 Setembro [acesso em 04 de Agosto de 2024];30;8(40):36845-36855. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37841134/. doi: 10.1021/acsomega.3c03683. PMID: 37841134.

58. Fu M, Fernandez E, Martínez-Sánchez JM, Pascual JA, Schiaffino A, Agudo A, Ariza C, Borràs JM, Samet JM; DCOT Study investigators. Salivary cotinine concentrations in daily smokers in Barcelona, Spain: a cross-sectional study. BMC Public Health. 2009 Setembro [acesso em 10 de Agosto de 2024];3;9:320.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19728886/. doi: 10.1186/1471-2458-9-320. PMID: 19728886.

59. Delfim CIG. Avaliação dos teores de nicotina e cotinina, por cromatografia em fase gasosa, em urina de crianças fumantes passivas [dissertação na internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2004. 114 páginas.

60. Byrd GD, Davis RA, Ogden MW. A rapid LC-MS-MS method for the determination of nicotine and cotinine in serum and saliva samples from smokers: validation and comparison with a radioimmunoassay method. J Chromatogr Sci. 2005 Março [acesso em 30 de Agosto de 2024];43(3):133-40. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15842752/. doi: 10.1093/chromsci/43.3.133. PMID: 15842752.

61. Parzynski CS, Jaszyna-Gasior M, Franken FH, Moolchan ET. Measuring nicotine intake among highly-dependent adolescent smokers: comparability of saliva and plasma cotinine concentrations. Pharmacol Biochem Behav. 2008 Abril [acesso em 30 de Agosto de 2024];89(2):145-9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199474/. doi:0.1016/j.pbb.2007.12.003. PMID: 18199474

62. Jarvis MJ, Primatesta P, Erens B, Feyerabend C, Bryant A. Measuring nicotine intake in population surveys: comparability of saliva cotinine and plasma cotinine estimates. Nicotine Tob Res. 2003 Junho [acesso em 30 de Agosto de 2024];5(3):349-55. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12791530/. doi: 10.1080/1462220031000094213. PMID: 12791530.

63. Mahabee-Gittens EM, Mazzella MJ, Doucette JT, Merianos AL, Stone L, Wullenweber CA, A Busgang S, Matt GE. Comparison of Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Methods to Measure Salivary Cotinine Levels in Ill Children. Int J Environ Res Public Health. 2020 Fevereiro [acesso em 30 de Agosto de 2024];12;17(4):1157.Disponível em: https://www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-Liquid-Chromatography-Mass-and-Assay-Mahabee-gittens-Mazzella/af272700d0fe834923bbb0ee954b822e5663d6b2. doi: 10.3390/ijerph17041157. PMID: 32059566.

64. Bacha ZA, Salameh P, Waked M. Saliva cotinine and exhaled carbon monoxide levels in natural environment waterpipe smokers. Inhal Toxicol. 2007 Julho [acesso em 30 de Agosto de 2024];19(9):771-7. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613086/. doi: 10.1080/08958370701401699. PMID: 17613086.

65. Fallatah AA, Hanafi R, Afifi I. Comparison of Cotinine Salivary Levels between Smokers : Smokers and Non-Smokers Passive. The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 2018 Janeiro [acesso em 30 de Agosto de 2024];70(6):982–989. Disponível em: https://applications.emro.who.int/imemrf/Egypt_J_Hosp_Med/Egypt_J_Hosp_Med_2018_70_6_982_989.pdf. DOI: 10.12816/0044349

66. Campuzano JC, Hernandez-Avila M, Jaakkola MS, Lazcano Ponce E, Kuri Morales P, Bautista P, Benowitz NL, Ceraso M, Blackford A, Samet JM. Determinants of salivary cotinine levels among current smokers in Mexico. Nicotine Tob Res. 2004 Dezembro [acesso em 10 de Setembro de 2024];6(6):997-1008. Disponível em: https://research.birmingham.ac.uk/en/publications/determinants-of-salivary-cotinine-levels-among-current-smokers-in. doi: 10.1080/14622200412331324956. PMID: 15801572.

67. Honarmand M, Nakhaee A, Moradi M. Comparison of Salivary Cotinine Concentrations in Male Smokers and Smokeless Tobacco Users. Asian Pac J Cancer Prev. 2018 Maio [acesso em 10 de Setembro de 2024]26;19(5):1363-1366. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29802701/. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.5.1363. PMID: 29802701; PMCID: PMC6031843.

68. Swan GE, Habina K, Means B, Jobe JB, Esposito JL. Saliva cotinine and recent smoking--evidence for a nonlinear relationship. Public Health Rep. 1993 Novembro-Dezembro [acesso em 10 de Setembro];108(6):779-83. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8265764/. PMID: 8265764.

69. ETTER, J. F.; VU DUC, T.; PERNEGER, T. VEtter JF, Vu Duc T, Perneger TV. Saliva cotinine levels in smokers and nonsmokers. Am J Epidemiol. 2000 Fevereiro

[acesso em 10 de Setembro de 2024]1;151(3):251-8. Disponível em; https://www.researchgate.net/publication/12643913_Etter_JF_Vu_Duc_T_Perneger_TV_Saliva_cotinine_levels_in_smokers_and_nonsmokers_Am_J_Epidemiol_151_251-258. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010200. PMID: 10670549.

70. Benowitz NL, Jacob P 3rd. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. Clin Pharmacol Ther. 1994 Novembro [acesso em 10 de Setembro de 2024];56(5):483-93. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7955812/. doi: 10.1038/clpt.1994.169. PMID: 7955812.

71. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS. The human serum metabolome. PLoS One. 2011 Fevereiro [acesso em20 de Setembro de 2024]16;6(2):e16957. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21359215/. doi: 10.1371/journal.pone.0016957. PMID: 21359215.

72. Lu Y, Zhao CZ, Huang JQ, Zhang Q. The timescale identification decoupling complicated kinetic processes in lithium batteries, Julho 2022 [acesso em 30 de Setembro de 2024];6,(6):1172–1198. Disponível em: https://colab.ws/articles/10.1016/j.joule.2022.05.005. doi:10.1016/j.joule.2022.05.005.

73. Rabinowitz JD, Enerbäck S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. Nat Metab. 2020 Julho [acesso em 30 de Setembro de 2024];2(7):566-571. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32694798/. doi: 10.1038/s42255-020-0243-4. PMID: 32694798.

75. Jang C, Hui S, Zeng X, Cowan AJ, Wang L, Chen L, Morscher RJ, Reyes J, Frezza C, Hwang HY, Imai A, Saito Y, Okamoto K, Vaspoli C, Kasprenski L, Zsido GA 2nd, Gorman JH 3rd, Gorman RC, Rabinowitz JD. Metabolite Exchange between Mammalian Organs Quantified in Pigs. Cell Metab. 2019 Setembro [acesso em 30 de Setembro de 2024]3;30(3):594-606.e3. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31257152/. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.002.

76. Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, Reya T, Le Zhan, Yanxiang Guo J, White E, Rabinowitz JD. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. Nature. 2017 Novembro [acesso em 30 de Setembro de 2024]2;551(7678):115-118. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29045397/. doi: 10.1038/nature24057. PMID: 29045397.

77. Apostolova P, Pearce EL. Lactic acid and lactate: revisiting the physiological roles in the tumor microenvironment. Trends Immunol. 2022 Dezembro [acesso em 10 de Outubro de 2024];43(12):969-977. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36319537/. doi: 10.1016/j.it.2022.10.005. PMID: 36319537.

78**.** Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, Wigal T, Butt Y, Ni M, Torrealba J, Oliver D, Lenkinski RE, Malloy CR, Wachsmann JW, Young JD, Kernstine K, DeBerardinis RJ. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. Cell. 2017 Outubro [acesso em 20 de Outubro de 2024];5;171(2):358-371.e9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28985563/. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.019. PMID: 28985563.

79. Tasdogan A, Faubert B, Ramesh V, Ubellacker JM, Shen B, Solmonson A, Murphy MM, Gu Z, Gu W, Martin M, Kasitinon SY, Vandergriff T, Mathews TP, Zhao Z, Schadendorf D, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. Nature. 2020 Janeiro [acesso em: 20 de Outubro de 2024];577(7788):115-120. doi: 10.1038/s41586-019-1847-2. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31853067/. PMID: 31853067..

80. Adhikari E, Liu Q, Burton C, Mockabee-Macias A, Lester DK, Lau E. L-fucose, a sugary regulator of antitumor immunity and immunotherapies. Mol Carcinog. 2022 Maio [acesso em: 10 de Dezembro de 2024];61(5):439-453. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35107186/. doi: 10.1002/mc.23394. PMID: 35107186.

81. Conboy E, Vairo F, Schultz M, Agre K, Ridsdale R, Deyle D, Oglesbee D, Gavrilov D, Klee EW, Lanpher B. Mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase Deficiency: Unique Presenting Laboratory Values and a Review of Biochemical and Clinical Features. JIMD Rep. 2017 Outubro [acesso em 10 de Dezembro de 2024];2018;40:63-69. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29030856/. doi: 10.1007/8904_2017_59. PMID: 29030856.

82. Bastian K, Scott E, Elliott DJ, Munkley J. FUT8 Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Janeiro [acesso em 10 de Dezembro de 2024]5;22(1):455. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27091662/. doi: 10.3390/ijms22010455. PMID: 33466384.

83. Guo L, Cui C, Wang J, Yuan J, Yang Q, Zhang P, Su W, Bao R, Ran J, Wu C. PINCH-1 regulates mitochondrial dynamics to promote proline synthesis and tumor growth. Nat Commun. 2020 Outubro [acesso em 07 de Janeiro de 2025] 1;11(1):4913. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33004813/. doi: 10.1038/s41467-020-18753-6. PMID: 33004813; PMCID: PMC7529891.

84. Phang JM. Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses. Antioxid Redox Signal. 2019 Fevereiro [acesso em 07 de Janeiro de 2025]1;30(4):635-649.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28990419/. doi: 10.1089/ars.2017.7350. PMID: 28990419.

85. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. J Thorac Oncol. 2015 Setembro [acesso em 10 de Janeiro de

2025];10(9):1240-1242.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26291007/. doi: 10.1097/JTO.0000000000000663. PMID: 26291007.

86. Lee KB, Ang L, Yau WP, Seow WJ. Association between Metabolites and the Risk of Lung Cancer: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Metabolites. 2020 Setembro [acesso em 07 de Janeiro de 2025] 5;10(9):362. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32899527/. doi: 10.3390/metabo10090362. PMID: 32899527.

87. Khan AP, Rajendiran TM, Ateeq B, Asangani IA, Athanikar JN, Yocum AK, Mehra R, Siddiqui J, Palapattu G, Wei JT, Michailidis G, Sreekumar A, Chinnaiyan AM. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. Neoplasia. 2013 Maio [acesso em 10 de Janeiro de 2025];15(5):491-501.Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23633921/ doi: 10.1593/neo.13314. PMID: 23633921.

88. Chen X, Overcash R, Green T, Hoffman D, Asch AS, Ruiz-Echevarría MJ. The tumor suppressor activity of the transmembrane protein with epidermal growth factor and two follistatin motifs 2 (TMEFF2) correlates with its ability to modulate sarcosine levels. J Biol Chem. 2011 Maio [acesso em 10 de Janeiro de 2025];6;286(18):16091-100.Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3091218/. doi: 10.1074/jbc.M110.193805. PMID: 21393249.

89. Weber DD, Thapa M, Aminzadeh-Gohari S, Redtenbacher AS, Catalano L, Feichtinger RG, Koelblinger P, Dallmann G, Emberger M, Kofler B, Lang R. Targeted Metabolomics Identifies Plasma Biomarkers in Mice with Metabolically Heterogeneous Melanoma Xenografts. Cancers (Basel). 2021 Janeiro [acesso em 10 de Janeiro de 2025];13(3):434. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33498757/. doi: 10.3390/cancers13030434. PMID: 33498757.

90. Fukushi A, Kim HD, Chang YC, Kim CH. Revisited Metabolic Control and Reprogramming Cancers by Means of the Warburg Effect in Tumor Cells. Int J Mol Sci. 2022 Setembro [acesso em 10 de Janeiro de 2025]2;23(17):10037. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36077431/. doi: 10.3390/ijms231710037. PMID: 36077431; PMCID: PMC9456516.

91. Akins NS, Nielson TC, Le HV. Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. Curr Top Med Chem. 2018 [acesso em 10 de Janeiro de 2025];18(6):494-504. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788892/. doi: 10.2174/1568026618666180523111351. PMID: 29788892.

92. Chen X, Chen S, Yu D. Protein kinase function of pyruvate kinase M2 and cancer. Cancer Cell Int. 2020 Outubro [acesso em 10 de Janeiro de 2025]29;20(1):523. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33292198/ doi: 10.1186/s12935-020-01612-1. PMID: 33292198.

93. Pekel G, Ari F. Therapeutic Targeting of Cancer Metabolism with Triosephosphate Isomerase. Chem Biodivers. 2020 Maio [acesso em 10 de Janeiro

de 2025];17(5):e2000012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32180338/. doi: 10.1002/cbdv.202000012. PMID: 32180338.

94. Lone SN, Maqbool R, Parray FQ, Ul Hussain M. Triose-phosphate isomerase is a novel target of miR-22 and miR-28, with implications in tumorigenesis. J Cell Physiol. 2018 Novembro [acesso em 10 de Janeiro de 2025](11):8919-8929. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29856481/. doi: 10.1002/jcp.26821. PMID: 29856481.