Camila dos Santos Arcas

Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e expressão de miRNAs em sangue periférico de humanos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências da Reabilitação

Orientadora: Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Arcas, Camila dos Santos

Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo
sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e
expressão de miRNAs em sangue periférico de humanos
/ Camila dos Santos Arcas. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Naomi Kondo Nakagawa.

Descritores: 1.microRNAs 2.Fumar 3.Abandono do
hábito de fumar 4.Neoplasias pulmonares 5.Inflamação
6.Biomarcadores

USP/FM/DBD-006/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta dissertação aos meus pais, Luiz Fernando e
Katia, ao meu irmão Luiz Henrique e aos meus avós
José Ney e Vanda que sempre me incentivam, apoiam e
juntos me ajudam a realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Naomi Kondo Nakagawa**, por sua disponibilidade e incentivo, sempre auxiliando da melhor forma possível em todas as etapas para a conclusão deste trabalho. Eternamente grata por todo o apoio e ensinamentos, tanto pessoais quanto profissionais.

Aos amigos do laboratório e alunos, **Tômas de Santana Carvalho, Tatiana Satie Kawauchi, Juliana de Araújo Nascimento, Geisa Andrade, Daniela Utiyama, Mariane Cecília dos Reis, Katia Moreno, Vanessa Mair**, por todo apoio e companheirismo, sempre dispostos a auxiliar no que foi possível e com quem pude compartilhar momentos de muita alegria e dividir as angústias durante toda essa trajetória. Obrigada pela parceria.

Aos pesquisadores, **Dra. Regiani Carvalho Oliveira, Dra. Mariângela Macchione, Dra. Kelly Yoshizaki, Dr. Luís Fernando Amato-Lourenço, Daniela Perroni, Juliana Smelan e Juliane Nunes** pela colaboração, conhecimento compartilhado e amizade.

A todos os colegas e colaboradores do **Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM 5)** e do **Laboratório de Ciências da Reabilitação (LIM 34)** pela disponibilidade de espaço para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur** pela colaboração e apoio com as análises estatísticas.

À **Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** em especial a Erinalva da Conceição Batista e Isabel Figueiredo pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica desta dissertação.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** por toda assistência prestada no desenvolvimento do trabalho e às secretarias Ana Dantas e Audrey Rose pela atenção e auxílio nas questões burocráticas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001 com apoio para realização deste trabalho.

Ao **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia**, em especial à equipe multiprofissional do **Programa de Cessação ao Tabagismo**: Dr. Márcio Gonçalves de Sousa, psicóloga Denise de Paula, enfermeira Neusa Portela, nutricionista Cristiane Kovacs, assistente social Débora Vieira e residentes pelo acolhimento, ensinamentos e colaboração com a triagem e acompanhamento dos pacientes. Agradeço também ao **Laboratório de Biologia Molecular**: Prof. Dr. Mário Hirata, Gisele Bastos, Adriana Garofalo, Jéssica Bassani e especialmente à Hui-Tzu Lin Wang pela parceria, colaboração e ajuda no processamento e análise dos dados.

Às grandes incentivadoras, exemplos e queridas amigas **Dra. Iracema Ioco Kikuchi Umeda** e **Vanessa Marques** que plantaram em mim a semente pela pesquisa e me fizeram entender que seria uma experiência incrível e de muito crescimento. Obrigada por acreditarem e me fazerem acreditar em mim.

A todos os amigos que souberam entender minha ausência em alguns momentos cruciais para o desenvolvimento do trabalho e sempre enviaram palavras de incentivo e se fizeram presentes, em especial: **Mariana Borrego, Jéssica Arantes, Maryna Napolitano, Marina Canetta, Carolina Sambuichi, Matheus Marchetti, Jéssica Costa, Marceli Benitez, Alline Cazonato,**

Marianna Paffetti e Tammi Moraes. Obrigada pelo carinho e apoio constantes.

À grande amiga **Dayane Nunes Rodrigues** com quem, desde a especialização, compartilho a busca pelo conhecimento e jornada acadêmica e tenho muita admiração pela pessoa e profissional que vi se tornar. Obrigada por todo o apoio e amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho do **serviço de Fisioterapia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (FisioUni)** por todo apoio logístico, disponibilidade para espaço de coletas e companhia diária.

A todos os amigos do **departamento de Tiro com Arco do Círculo Militar de São Paulo** que estiveram presentes, acompanharam as diversas fases emocionais que este trabalho me proporcionou e tornaram mais divertidos meus treinos que foram sempre o refúgio da rotina dos estudos.

Aos meus pais **Luiz Fernando e Katia** por serem meus grandes exemplos, sempre me incentivarem a buscar o meu melhor, o apoio incondicional em minhas escolhas e por tudo que me ensinaram e proporcionaram até hoje, sem vocês nada disso seria possível. Todo meu amor e admiração eterna.

Ao meu irmão **Luiz Henrique**, por toda parceria, apoio, carinho, momentos de descontração e ajuda sempre que possível.

Aos meus avós **José Ney e Vanda** exemplos de pessoas batalhadoras e família, sempre presentes e com palavras acolhedoras e apoio. Esta conquista também é de vocês e para vocês.

A todos os **voluntários** que tornaram este trabalho possível, por toda disponibilidade, paciência e contribuição.

A todos que torceram, participaram, acreditaram e contribuíram para que

este trabalho fosse realizado com excelência, meu muito obrigada! Foi um dos grandes desafios da minha vida!

“O propósito da luta é vencer. Não há vitória possível na defesa. A espada é mais importante que o escudo e a habilidade é mais importante do que qualquer um dos dois. A arma final é o cérebro. Tudo o mais é suplementar.”

John Steinbeck

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Tabagismo e mecanismos de defesa da via aérea.....	4
1.1.1 Disfunção dos mecanismos de defesa causadas pelo tabagismo.....	5
1.2 MicroRNAs.....	5
1.3 Biologia Molecular e Tabagismo.....	8
1.4 Biologia Molecular e Cessação do Tabagismo.....	9
2 OBJETIVO.....	13
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
3.1 Anamnese Clínica	16
3.2 Questionário de sintomas de vias aéreas SNOT20.....	16
3.3 Exame Físico.....	17
3.4 Monoximetria.....	17
3.5 Função Pulmonar por meio de Espirometria.....	17
3.6 Teste de tempo de trânsito da sacarina (TTS).....	18
3.7 Expressão de miRNAs em sangue periférico por meio de PCR array em sangue periférico.....	19
3.8 Análise estatística.....	20
4 RESULTADOS.....	23
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	38
7 ANEXOS.....	40
8 REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\Delta\Delta$ CT	Delta delta cycle time
3'UTR	região 3' não traduzida
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2
bpm	Batimentos por minuto
CVF	Capacidade vital forçada
cDNA	DNA complementar
CO	Monóxido de carbono
CPNPC	Câncer pulmonar de não pequenas células
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Exp-5	Exportina 5
FC	Frequência cardíaca
f	Frequência respiratória
GOLD	Iniciativa Global de doença pulmonar obstrutiva crônica
IMC	Índice de massa corpórea
Kg	Quilograma
Kg/m ²	Quilograma por metro ao quadrado
L	Litro
m	Metro
MP	Material particulado
miR*	microRNA estrela
miRNA	microRNA
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	minuto
MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Partes por milhão
PCR microarray	Reação em cadeia de polimerase em microarranjos
pred	valor predito

PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PPC	Controle Positivo de reação de PCR
pré-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primário
RISC	RNA – complexo de silenciamento induzido
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Respirações por minuto
s	segundos
SNOT-20	<i>SinoNasal Outcome Test</i>
SpO ₂	Saturação periférica de oxigênio
TMC	Transporte mucociliar
TTS	Tempo de trânsito da sacarina
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
WHO	<i>World Health Organization/Organização Mundial da Saúde</i>
µg	Microgramas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvio padrão ou número absoluto e proporção das características demográficas e clínicas de Tabagistas e Cessadores em T0.....	24
Tabela 2 -	Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) de espirometria entre os grupos, em avaliação T0 e T6.....	25
Tabela 3 -	Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) dos valores do questionário SNOT-20 entre os grupos, em avaliação T0 e T6.....	26
Tabela 4 -	Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) de cigarros/dia, SpO ₂ , COex e TMC entre os grupos, em avaliação T0 e T6.....	26
Tabela 5 -	Correlação entre as variáveis cigarro/dia e COex, cigarro/dia e TTS e entre COex e TTS.....	27
Tabela 6 -	Expressão dos miRNAs significativamente alterados no plasma de Tabagistas e Cessadores em T0, considerando os Tabagistas como controle.....	27
Tabela 7 -	Expressão dos miRNAs significativamente alterados no plasma de Tabagistas e Cessadores em T6, considerando Tabagistas como controle.....	28
Tabela 8 -	Expressão do miRNA hsa-miR-301b-3p no plasma de Tabagistas e de Cessadores comparando expressão em T6 e T0 em cada grupo.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da biogênese dos miRNAs.....	7
Figura 2 -	Protocolo do estudo.....	16
Figura 3 -	Teste de função pulmonar.....	18
Figura 4 -	Teste de trânsito da sacarina.....	19
Figura 5 -	Fluxograma do estudo.....	23
Figura 6 -	Níveis de expressão dos miRNAs diferentemente expressos no plasma de Tabagistas (Tab) e de Cessadores (Cess) em T0 (●), T6 (○) e entre os grupos	29

RESUMO

Arcas CS. *Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e expressão de miRNAs em sangue periférico de humanos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Objetivo: Investigar o perfil de miRNAs em indivíduos participantes de um grupo de cessação do tabagismo. **Métodos:** Caracterizamos os mecanismos de defesa das vias aéreas por meio do transporte mucociliar (TMC) e avaliamos a expressão de miRNAs no plasma de indivíduos participantes do Grupo de Cessação ao Tabagismo do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (n=28, idade média 56 anos), após seis meses eles foram divididos em 2 grupos: aqueles que obtiveram sucesso na cessação (Cessadores, n=18, idade média 57 anos, 11 homens) e aqueles que reduziram a exposição ao cigarro (20-90%) porém continuaram fumando (Tabagistas, n=10, três homens). **Resultados:** Na avaliação basal, as características clínicas, comorbidades, histórico de tabagismo e carga tabágica foram semelhantes entre os grupos. Observamos que os tabagistas apresentaram TMC prolongado e que a cessação do tabagismo induziu à normalização do TMC. Comparando os Cessadores com os Tabagistas, sete miRNAs foram regulados negativamente: miR-17 (-2.90-fold, p=0.029), miR-20a (-3.80-fold, p=0.021); miR-20b (-4.71-fold (p=0.027); miR-30a (-3.95-fold, p=0.024); miR-93 (-3.63-fold, p=0.022); miR-125a (-1.70-fold, p=0.038); and miR-195 (-5.37-fold, p=0.002). Após seis meses, seis miRNAs foram diferentemente expressos com regulação negativa nos Cessadores em relação aos Tabagistas: miR-17 (-5.30-x, p=0.012), miR-20a (-2.04f-x, p=0.017), miR-20b (-5.44-x, p=0.017), miR-93 (-4.00-x, p=0.041), miR-101 (-4.82-x, p=0.047) e miR-125b (-3.65-x, p=0.025). Entretanto, somente o grupo de Cessadores apresentou após 6 meses, uma regulação negativa significativa do miR-301b (-2.29-x, p=0.038). **Conclusão:** A redução da carga tabágica não foi suficiente para alterar esse perfil de expressão dos miRNAs. Somente a cessação do tabagismo promoveu regulação negativa do miR-301b que está relacionado com condições de hipóxia, de promoção da proliferação celular, da inibição da apoptose e aumento da resistência à quimioterapia.

Descritores: microRNAs; Fumar; Abandono do hábito de fumar; Neoplasias pulmonares; Inflamação; Biomarcadores.

ABSTRACT

Arcas CS. *Effects of smoking and smoking cessation on airway defense mechanisms and miRNA expression in human peripheral blood* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Objective: To investigate miRNAs profile in subjects who wanted to quit smoking along a 6-month period. **Methods:** We characterized the airway defense mechanism by means of mucociliary clearance (MCC) and we assessed plasma miRNAs expression in individuals that entered into a Smoking Cessation Program (n=28, mean age 56 y.) that were divided into two groups after a 6-month period: who successfully quit smoking (named "Quitters", n=18, mean age 57 y., 11 male) and who reduced the number of cigarettes smoked (20-90%) but failed to quit smoking (named "Smokers", n=10, mean age 52 y., 3 male). **Results:** At baseline, clinical characteristics, co-morbidities, smoking history and smoking index were similar between the two groups. Smokers presented prolonged MCT and smoking cessation induced normalization of the MCT. Quitters related to Smokers showed significant differences in expression of miR-17 (-2.90-fold, p=0.029), miR-20a (-3.80-fold, p=0.021); miR-20b (-4.71-fold (p=0.027); miR-30a (-3.95-fold, p=0.024); miR-93 (-3.63-fold, p=0.022); miR-125a (-1.70-fold, p=0.038); and miR-195 (-5.37-fold, p=0.002). After 6-month of follow-up, Quitters in relation to Smokers showed significant downregulation of six miRNAs: miR-17 (-5.30-fold, p=0.012), miR-20a (-2.04f-fold, p=0.017), miR-20b (-5.44-fold, p=0.017), miR-93 (-4.00-fold, p=0.041), miR-101 (-4.82-fold, p=0.047) and miR-125b (-3.65-fold, p=0.025). However, after a 6-month period, only Quitters showed significant downregulation on miR-301b (-2.29-fold, p=0.038). **Conclusion:** Reductions in smoking load was insufficient to change the miRNA profile. Only, smoking cessation downregulated miR-301b that is related to hypoxic conditions, promotion of cell proliferation, decreases in apoptosis and increases in resistance to chemotherapy.

Descriptors: microRNA; Smoking; Smoking cessation; Lung neoplasms; Inflammation; Biomarkers.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Para a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019) o tabagismo é caracterizado pela dependência física e psicológica do consumo de nicotina, substância presente no tabaco, e também como a principal causa evitável de morte. Considera-se tabagista, o indivíduo que fumou no mínimo 100 cigarros durante a vida e atualmente fuma todos os dias ou ocasionalmente (Reichert, 2008). O hábito de fumar é considerado como fator de risco não só para doenças pulmonares, como também para doença coronariana e acidente vascular cerebral. No mundo estima-se 1,2 bilhão de tabagistas, sendo 367 milhões de tabagistas passivos (WHO, 2019). Para cada pessoa que morre de uma doença relacionada ao tabagismo, mais 20 pessoas sofrem devido a uma doença grave relacionada ao uso do tabaco. Em todo o mundo o tabagismo causa cerca de sete milhões de mortes diretamente relacionadas ao uso do tabaco e 1,2 milhões se devem ao fato da exposição passiva, totalizando mais de 8 milhões de mortes por ano (WHO, 2019). Nos Estados Unidos, o tabagismo é responsável por cerca de uma em cada cinco mortes por ano, aproximadamente 443.000 mortes, sendo que, 49.000 dessas mortes estão relacionadas à exposição ao fumo passivo. No Brasil ocorrem aproximadamente 147 mil mortes por ano relacionadas ao tabagismo e para o sistema de saúde isto representa um custo anual aproximado de 23 bilhões de reais (Pinto, Pichon-Riviere, Bardach, 2015). Em média, os tabagistas morrem cerca de 13 a 14 anos mais cedo que os não tabagistas, em contrapartida, parar de fumar aumenta a expectativa e a qualidade de vida independente da faixa etária, incluindo os indivíduos já afetados pelas doenças causadas pelo uso do tabaco (CDC, 2003; CDC, 2008; INCA, 2011).

Estudos epidemiológicos realizados nos últimos 40 anos, mostraram que apesar de altas taxas de cessação ao tabagismo no mundo, a prevalência ainda é alta tanto em homens (21%) quanto em mulheres (6%) e a mortalidade anual relacionada ao fumo aumentou (Smith et al., 2016). Além disso, o cenário de epidemia do tabaco é mais evidente em países de baixa e média renda (Willinger et al., 2017; WHO, 2019).

A inalação de fumaça do cigarro é diretamente nociva ao epitélio respiratório e altera o batimento ciliar e demais funções do transporte mucociliar. Estudos experimentais em culturas de células epiteliais da região nasal mostram que o material particulado (MP) da fumaça de um cigarro provoca imediata e irreversível ciliostase (Cohen et al., 2009; Stanley et al., 1986). As exposições crônicas (de seis a dezoito meses) e intermitentes à fumaça de cigarro promovem alterações morfológicas no epitélio do trato respiratório e induzem perda de cílios, metaplasia e queratinização de células caliciformes, seguido de espessamento do epitélio e de inflamação da submucosa com infiltrado neutrofílico e de células inflamatórias mononucleares (linfócitos e macrófagos) (Mullen et al., 1987; Gaworski et al., 1998). Estudo realizado com camundongos demonstrou que a inflamação do epitélio respiratório induzida pela fumaça de cigarro pode persistir por um período prolongado mesmo após a cessação do tabagismo (Hamm et al., 2007).

A fumaça do cigarro causa modificações no ambiente celular, favorecendo o aparecimento de células cancerígenas caracterizadas por inibição da apoptose, inflamação imunológica, invasão de tecido e metástase, angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado e ruptura de energia celular, todos sinais de tumorigenicidade (Momi et al., 2014).

De forma aguda o tabagismo promove estresse oxidativo, por aumento de peróxidos plasmáticos e redução de antioxidantes, a longo prazo acarreta uma inflamação sistêmica crônica caracterizada por alta regulação de células inflamatórias circulantes, mediadores inflamatórios e proteínas. O desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) está relacionado com a ativação de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e secreção de mediadores inflamatórios que desencadeiam uma resposta inflamatória crônica no pulmão (Willinger et al., 2017).

O tabagismo já é considerado como causa estabelecida de comprometimento da função pulmonar, fator de risco para múltiplas patologias, induz alterações morfológicas no sistema cardiorrespiratório, com destaque para desenvolvimento de câncer de pulmão e de DPOC, que se caracteriza por obstrução irreversível ao fluxo aéreo e está descrita como a quarta principal causa de morte no mundo, sendo a cessação do tabagismo, a melhor estratégia de

proteção contra a alta morbidade e mortalidade associada ao tabagismo (Momi et al., 2014; Willinger et al., 2017; Doll et al., 2004; Anthoninsen et al., 2005).

1.1 Tabagismo e mecanismos de defesa da via aérea

O transporte mucociliar (TMC) é um dos mecanismos de defesa pulmonar, sendo o epitélio nasal a primeira barreira do trato respiratório à entrada de material particulado, microorganismos e gases no sistema respiratório. O TMC é um importante mecanismo de defesa pulmonar que remove esses agentes das vias aéreas e dos pulmões. Seu funcionamento depende de três componentes: batimento ciliar, quantidade e propriedades físicas do muco respiratório e interação muco-cílio (Hill; Webber, 1999; Macchione et al., 1999; Nakagawa et al., 2000; Nakagawa et al., 2005; Tuder et al., 2006). Para que o TMC seja eficiente, todas as estruturas e função precisam estar íntegros. O aumento da quantidade e/ou alterações das propriedades físicas do muco somado a disfunção dos cílios, prejudicando seu transporte, podem induzir à retenção de muco no trato respiratório (Hill; Webber, 1999; Nakagawa et al., 2000), o que expõe o epitélio respiratório a microorganismos e outros agentes agressores, e predispõe os indivíduos às infecções das vias aéreas e pulmões, podendo aumentar a morbidade e mortalidade dos indivíduos (Konrad et al., 1995; Meyer, 2004; Nakagawa et al., 2005).

O TMC é responsável por remover partículas e microorganismos inalados do sistema traqueobrônquico, porém a exposição crônica ao fumo tem efeitos deletérios sobre a função mucociliar, comprometendo a frequência do batimento ciliar e/ou alterações estruturais com redução do número de cílios. O teste de trânsito da sacarina (TTS) é um dos meios de avaliação do TMC, é um método simples, acessível e de baixo custo que consiste na observação direta do TMC nasal *in vivo* (Nicola et al., 2014; Oliveira-Maul et al., 2013). Em fumantes, o TMC nasal apresenta-se prolongado quando comparado com indivíduos não fumantes e o grau de comprometimento depende do tipo de cigarro fumado e da carga tabágica, em consequência esses indivíduos ficam mais suscetíveis ao acúmulo de secreção, inflamação, infecções respiratórias e outras doenças respiratórias (Proença et al., 2011; Konrad et al., 1995).

1.1.1 Disfunção dos mecanismos de defesa causadas pelo tabagismo

A longo prazo, o tabagismo induz alterações estruturais e funcionais no sistema respiratório, mesmo em fumantes jovens que não apresentam sintomas respiratórios (Nicola et al., 2014).

Em avaliação da eficiência dos cílios, através do TTS, o intervalo de tempo entre a deposição da sacarina e a percepção do sabor pelo paciente está geralmente aumentado nos pacientes fumantes, demonstrando um TMC prejudicado e com a cessação há perceptível melhora neste teste com reduções significativas dos valores entre o primeiro mês de abstenção até 12 meses (Utiyama et al., 2016). O TTS possui valor de normalidade de 12 minutos (Oliveira-Maul et al., 2013).

O tabagismo é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da DPOC e o método mais eficiente para amenizar o declínio acentuado do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), é a cessação do tabagismo. Alguns tabagistas, aproximadamente 30%, não apresentam sintomas crônicos ou alteração na função pulmonar, estes são muitas vezes denominados “fumantes saudáveis”. Acredita-se que mesmo estes indivíduos apresentem mudanças, porém sutis, na morfologia, inflamação e função pulmonar, logo, o uso do tabaco sempre irá afetar os pulmões, porém a extensão e a gravidade dessas alterações podem ser diferentes entre os indivíduos (Willemse et al., 2004, Nicola et al., 2014).

1.2 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs endógenos, de fitas simples, cadeias curtas compostas de aproximadamente 22 nucleotídeos não-codificantes e altamente conservadas. Os miRNAs são reguladores da expressão gênica tanto em plantas como em animais com capacidade de inibição direta da tradução da proteína ou degradação do RNA mensageiro (RNAm), sendo relacionados a diversos processos biológicos, incluindo o câncer (Ricarte-Filho; Kimura, 2006; Pottelberge et al., 2011; Willinger et al., 2017). Em estudos de câncer, os miRNAs foram associados a duas funções regulatórias: o estímulo à expressão de oncogenes (“oncomirs”) ou supressão tumoral (Ricarte-Filho; Kimura, 2006; Esquela-Kerscher; Slack, 2006).

O processo de biogênese dos miRNAs se inicia dentro do núcleo da célula, onde há a transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, formando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) composto por cap 5' e uma cauda poli (A). A fita do pri-miRNA, transcrita a partir do DNA, possui alta complementaridade e se liga nela mesma, formando uma estrutura denominada "hairpin" ou grampo, com a característica formação de um "loop" em uma das extremidades. Ainda no núcleo, o pri-miRNA passa por um processo de clivagem de seu "hairpin" pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8, formando uma molécula precursora do miRNA maduro, o pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é transportado pela exportina 5 (Exp-5) para o citoplasma, onde ele é processado pela RNase III, Dicer, que cliva o "loop" e forma um miRNA de fita dupla com cerca de 19 a 25 nucleotídeos. Somente uma das cadeias desse RNA de dupla fita é processada e introduzida ao complexo RISC (RNA- complexo de silenciamento induzido), que tem como principais componentes as proteínas argonautas que irão controlar a expressão pós-transcricional dos genes-alvos, enquanto a outra cadeia sofrerá degradação (Figura 1) (Arantes et al., 2015; Ricarte-Filho; Kimura, 2006).

A ação desses miRNAs na regulação pós-transcricional só é possível se houver um grau de complementaridade da região 3' não traduzida (3'UTR) com o RNAm-alvo, podendo gerar inibição traducional de proteínas ou degradação do RNAm (Figura 1). Por possuírem sequências pequenas e funcionarem sem a necessidade de pareamento completo, os miRNAs podem interagir individualmente com centenas de genes (Pottelberge et al., 2011).

Figura 1. Representação da biogênese dos miRNAs. Adaptado de <http://uranus.mtveurope.org/wklim/research.html>.

Em mamíferos, os nucleotídeos da extremidade 5' do miRNA constitui uma “região semente” que pode realizar um pareamento imperfeito a uma sequência complementar da região 3' UTR do RNAm e em alguns casos apresentar pareamento perfeito com a sequência do RNAm-alvo. Sendo assim um miRNA pode interferir em centenas de moléculas diferentes de RNAm alvo, mas também pode haver redundância entre miRNAs, onde uma molécula de RNAm pode ser alvo de mais de um miRNA, originando uma complexa rede reguladora, onde os efeitos e as propriedades biológicas de um específico miRNA não seguem uma explicação linear (Momi et al., 2014).

Os estudos sobre miRNAs têm associado alterações da expressão de miRNAs a diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, DPOC e doença pulmonar inflamatória (Willinger et al., 2017; Lalem; Devaux, 2019). As pesquisas para delinear a função e os mecanismos dos miRNAs contribuem

para métodos de diagnóstico, além de auxiliar na busca de novos alvos terapêuticos (Weber et al., 2010; Lu et al., 2005). Para a identificação e quantificação de miRNAs em diferentes quadros clínicos, a análise de sangue periférico pode ser uma alternativa acessível, de relativa facilidade e passível de armazenamento para futuras extrações de RNA, caracterizando-se como uma forma estável e de alta pureza. Os miRNAs do sangue podem estar presentes em leucócitos, plaquetas, eritrócitos e plasma isento de células (Willinger et al., 2017; Bough et al., 2013).

1.3 Biologia Molecular e Tabagismo

Há diversos trabalhos na literatura mostrando que o tabagismo promove alterações moleculares irreversíveis e, dessa forma, estas alterações tabagismo-induzidas podem ser a chave para as mutações de células normais, principalmente as células pulmonares, que podem evoluir com hiperplasia e tumorigênese por efeito da fumaça do cigarro que ativa várias reações bioquímicas em cadeia e demais vias de feedback, envolvidos na regulação de genes inflamatórios e participando da patogênese de diversos tipos de câncer (Shembri et al., 2008; Momi et al., 2014). Sendo assim, a expressão desregulada desses miRNAs podem formar uma ponte entre a inflamação persistente das vias aéreas, as alterações na homeostase celular e a oncogênese, aumentando o risco de diversos tipos de câncer em pacientes com DPOC (Momi et al., 2014).

Alguns estudos sugerem que, em sua maioria, os miRNAs são regulados negativamente pela exposição à fumaça do cigarro e analisando os alvos destes miRNAs é possível justificar alterações no perfil inflamatório, desenvolvimento celular e diferenciação do epitélio das vias aéreas, mecanismos chaves para a patogênese de doenças respiratórias e alguns tipos de câncer (Momi et al., 2014). Por outro lado, Takahashi et al. (2013) avaliaram o perfil de miRNAs plasmáticos em 11 indivíduos tabagistas e sete não tabagistas e verificaram 43 miRNAs regulados positivamente de modo significativo no sangue dos tabagistas em relação aos não tabagistas. Alguns dos miRNAs altamente expressos em fumantes estavam relacionados a estresse oxidativo e ao desenvolvimento de diversas doenças.

Em estudo de Framingham, um grupo de pesquisadores (Willinger et al., 2017) avaliou o perfil biomolecular de miRNAs em sangue periférico de tabagistas (n=524), ex-tabagistas (n=2.079) e nunca tabagistas (n=2.420) e identificaram 283 miRNAs por transcrição reversa. Seis miRNAs foram associados ao tabagismo (miR-25, miR-181a, miR-342, miR-423, miR-1180, miR-1285) destes, cinco miRNAs ligados às vias inflamatórias (miR-25, miR-181a, miR-423, miR-1180, miR-1285) estavam pouco expressos em tabagistas. Em conjunto, os achados destes estudos permitem compreender uma assinatura de miRNAs relacionados ao tabagismo e relacioná-los com fenótipos clínicos associados ao fumo, expressão gênica e sinalização inflamatória pulmonar.

Os miRNAs podem ser expressos de forma específica em cada tecido ou de forma onipresente, necessitando um estudo aprofundado em relação às funções de cada miRNA e seus alvos para de fato identificá-lo como biomarcador de determinada doença. De todo modo, diversos estudos confirmam que a fumaça do cigarro causa alterações no perfil dos miRNAs caracterizando-os como biomarcadores da exposição à fumaça do cigarro ou de doenças relacionadas ao tabagismo (Harvey et al., 2007; Huang et al., 2014; Bought et al., 2013).

1.4 Biologia Molecular e Cessação do Tabagismo

A cessação do tabagismo tem efeitos benéficos sobre a estrutura e função do epitélio respiratório, promove melhora da hiperresponsividade brônquica e dos sintomas respiratórios além de impedir a progressão da piora da disfunção pulmonar (Willemse et al., 2004; Simmons et al., 2005). Por outro lado, mesmo após a cessação do tabagismo, alguns processos patológicos pulmonares como modificações na expressão de diversos genes do epitélio respiratório relacionados à inflamação crônica da via, à DPOC e ao câncer pulmonar parecem persistir (Wang et al., 2015).

Os miRNAs têm sido descritos como diferentemente expressos em biópsias ou desregulados em indivíduos com doenças pulmonares relacionadas ao tabagismo, e desta forma são descritos como possíveis biomarcadores para diagnóstico precoce de DPOC e câncer de pulmão e

acompanhamento de estratégias de tratamento como, por exemplo, análise de mecanismos de dependência à nicotina e à cessação do tabagismo (Rizk et al., 2018; Bough et al., 2013). Em estudo usando escarro para análise, Pottelberge et al. (2011), mostraram que os níveis de expressão do let-7c e miR-125b estavam negativamente expressos em fumantes com DPOC quando comparado com não fumantes e tiveram níveis de expressão muito semelhantes quando comparados ex-fumantes com DPOC e não fumantes. Estes resultados sugerem que a expressão dos miRNAs let-7c e miR-125b podem estar associados ao desenvolvimento da DPOC enquanto é mantido o uso do tabaco, porém não interfere na persistência da inflamação das vias aéreas, após a cessação do tabagismo.

Wang e colaboradores (2015) verificaram o perfil de expressão de miRNAs no escarro de indivíduos tabagistas e não tabagistas e, em sequência, avaliaram os efeitos da cessação ao tabagismo no perfil de expressão dos miRNAs após três meses. Em primeira análise, 34 miRNAs foram associados ao tabagismo e após três meses de cessação, 22 destes 34 miRNAs retornaram aos níveis de expressão dos não tabagistas, porém os outros 12 (35%) não retornaram a níveis dos controles: sete miRNAs (miR-133a, miR-133b, miR-487b, miR-550, miR-634, miR-1226*, miR-1260) foram regulados positivamente e cinco miRNAs (miR-218, miR-224*, miR-1246, miR-1975, miR-3201) foram regulados negativamente. Estes 12 miRNAs foram relacionados ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao tabagismo, como DPOC e câncer de pulmão. Nesse estudo, os autores levantaram a hipótese de que três meses de cessação pode não ter eficácia total na normalização dos níveis desses miRNAs, mas que talvez um tempo maior de cessação possa influenciar neste desfecho.

Estudos tanto em animais (ratos) como em humanos mostram que a exposição à fumaça do cigarro altera a expressão de RNAm e que essas alterações desaparecem após a cessação de estímulos lesivos em algumas horas, devido à meia-vida curta do RNAm. Por lado, estímulos lesivos continuados e/ou mais prolongados podem promover alterações no proteoma (conjunto de proteínas e variantes de proteínas expressas em um sistema em resposta a estímulos ambientais ou temporais), cuja meia-vida é maior, dessa

forma, a cessação desses estímulos pode reduzir ou normalizar essas alterações após semanas, meses ou anos de cessação (Izzotti et al., 2010; Bough et al., 2013).

2. OBJETIVOS

O presente estudo do tipo observacional longitudinal prospectivo teve os objetivos de:

- 1) identificar e quantificar a expressão de miRNAs em sangue periférico de indivíduos incluídos em um Programa de Cessação do Tabagismo,
- 2) comparar a expressão de miRNAs entre os grupos de indivíduos classificados como Cessadores (indivíduos que tiveram sucesso na cessação do tabagismo) e como Tabagistas (indivíduos que reduziram o número de cigarros por dia mas não cessaram do tabagismo) e
- 3) investigar mecanismos de defesa das vias aéreas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente protocolo de estudo do tipo longitudinal prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE 33427014.0.0000.0065) (Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC, CAAE 33427014.0.3001.5462) (Anexo C) e seguiu as recomendações da declaração de Helsinque.

Os indivíduos foram incluídos no estudo após concordância com o termo de consentimento livre e esclarecido, de ambos os sexos, idade entre 18 e 70 anos recrutados no IDPC, participantes voluntários do Programa de Cessação do Tabagismo do IDPC. Os critérios de exclusão foram inabilidade de sentir o gosto da sacarina, cirurgia prévia do nariz e infecção respiratória nos 30 dias anteriores à entrada no estudo.

O Programa de Cessação do Tabagismo do IDPC é desenvolvido por uma equipe multiprofissional (médico, fisioterapeuta, psicólogo, enfermeiro, nutricionista, assistente social e dentista) para os usuários do IDPC que são recrutados pela assistente social por meio de uma entrevista motivacional para a cessação do tabagismo. Com a avaliação sendo positiva, os indivíduos são convidados a participarem do Programa com duração de dois meses, consistindo de etapas:

- a) uma avaliação médica inicial para determinar o tratamento medicamentoso individual com custo zero (fornecido pela farmácia hospitalar): bupropiona oral e adesivo de nicotina, e se necessário, reavaliações médicas para modificações na prescrição,
- b) duas avaliações nutricionais, sendo uma no início e a outra no final do programa, e
- c) participações em reuniões semanais para palestras educacionais de mudança de hábitos de vida (uma vez por semana).

Para se determinar o uso do tabaco nos indivíduos e classificá-los como Cessadores e Tabagistas, utilizamos a quantificação do monóxido de carbono exalado (COex, ppm), considerando o valor de COex > 6 ppm como tabagista

ativo, de acordo com as Diretrizes para Cessação do Tabagismo da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (Reichert et al., 2008; Kotz, 2012). Após concordarem com a participação no estudo, os indivíduos foram convocados para uma avaliação basal e após seis meses realizaram a reavaliação (Figura 2).

Figura 2. Protocolo do estudo.

3.1 Anamnese Clínica

A anamnese clínica foi realizada por questionário de informações gerais do indivíduo incluindo dados e antecedentes pessoais sobre saúde e doenças e história tabágica.

3.2 Questionário de sintomas de vias aéreas *SinoNasal Outcome Test* (SNOT-20).

O questionário SNOT-20, validado para a língua portuguesa (Bezerra et al., 2011), é constituído por 20 itens sobre sintomas sinonasais, sendo as respostas pontuadas como problemas em uma escala de zero a cinco: (0) nenhum, (1) muito pequeno, (2) pequeno, (3) moderado, (4) sério e (5) pior possível. O indivíduo também pode destacar até cinco sintomas que julgar mais prejudiciais para a sua saúde diária. As primeiras 10 questões são sobre os sintomas sinonasais e as demais questões são sobre a qualidade do sono, tendo como enfoque a gravidade desses sintomas e seus impactos

sociais/emocionais (Piccirillo et al., 2002).

3.3 Exame Físico

Após 10 minutos de repouso em sedestação em cadeira com encosto, foram registrados os seguintes parâmetros clínicos: (a) pressão arterial sistêmica (mmHg), (b) frequência cardíaca (FC, bpm), (c) saturação periférica de oxigênio (SpO₂, %), (d) frequência respiratória (f, rpm), peso (kg) e altura (m) para cálculo do índice de massa corporal (IMC, kg/m²).

3.4 Monoximetria

A quantificação do monóxido de carbono exalado (CO_{ex}) foi realizada com monoxímetro digital Micro CO analyzer (Cardinal Health, U.K 232 Ltd.). O indivíduo permaneceu sentado em cadeira com encosto, foi solicitado que realizasse inspiração profunda com pausa de 10 segundos, o indivíduo foi conectado ao aparelho por meio de bocal descartável e solicitado que realizasse uma expiração tranquila e prolongada. Consideramos o valor de CO_{ex} > 6 ppm para tabagistas ativos, de acordo com as Diretrizes para Cessação do Tabagismo da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (Reichert et al., 2008, Kotz, 2012). Pequenas alterações foram consideradas devido a influências ambientais (emissões de tráfego, proximidade a outros fumantes) as quais o indivíduo foi exposto no período de 2 a 5 horas anteriores à avaliação, tempo considerado devido a meia-vida do CO. (Becoña, Míguez, 2006, Deveci et al., 2004).

3.5 Função Pulmonar por meio de Espirometria

A espirometria foi realizada nos tempos T0 e T6 com o espirômetro portátil digital (Koko Legend, Inspire Health Inc., Longmont, USA). Brevemente, o indivíduo permaneceu sentado em uma cadeira com encosto e utilizou um clipe nasal durante todo o teste para respirar oralmente conectado ao aparelho por meio de bocal estéril (Figura 3). Durante o teste, o indivíduo foi orientado a realizar inicialmente algumas respirações tranquilas e em seguida a inspirar profundamente o máximo possível e expirar totalmente o mais rápido possível, porém com duração entre 5 e 6 segundos. Os indivíduos repetiram o teste por

pelo menos três vezes, com no mínimo um minuto de intervalo entre elas para gerar três curvas aceitáveis e duas reprodutíveis, isto é, os maiores valores de capacidade vital forçada (CVF) e de volume expirado no primeiro segundo (VEF_1) devem diferir menos que 150 mL (Miller et al., 2005; GOLD, 2017; Pereira, 2002).

Registramos os valores absolutos e preditos (%) das seguintes variáveis: CVF (L), volume expiratório no primeiro segundo (VEF_1 , L) e a razão VEF_1 /CVF. Para obter os valores preditos, os valores absolutos de CVF e VEF_1 foram corrigidos de acordo com dados obtidos para a população brasileira (Pereira et al., 2007). Para detecção de DPOC, seguimos as recomendações da American Thoracic Society (Culver et al., 2017) e da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (Pereira; Neder, 2002) considerando duas variáveis simultaneamente: valores de $VEF_1 < 80\%$ do predito e uma relação VEF_1 /CVF $< 0,7$.

Figura 3. Teste de função pulmonar.

3.6 Teste de tempo de trânsito da sacarina (TTS)

O TMC foi avaliado nos tempos T0 e T6, por meio do teste de trânsito da sacarina (TTS). Na narina de maior fluxo aéreo, colocamos aproximadamente 25 μ g de sacarina sódica granulada no bordo inferior da narina, sendo cronometrado o tempo (em minutos) entre o depósito da sacarina até o

momento que o indivíduo relatou sentir um gosto diferente (doce ou amargo) na garganta (Figura 4). Os indivíduos foram orientados a permanecerem sentados e não se movimentarem (andar, falar, tossir, espirrar, coçar ou assoar o nariz). O TTS normal é ≤ 12 minutos (Oliveira-Maul et al., 2013). Nos casos em que o indivíduo não sentiu o gosto da sacarina em 60 minutos, testamos sua capacidade de percepção gustativa da sacarina colocando-a em sua língua (Nakagawa et al., 2000; Oliveira-Maul et al., 2013; Nicola et al., 2014).

Figura 4. Teste de trânsito da sacarina.

3.7 Expressão de miRNAs em sangue periférico por meio de PCR array em sangue periférico

O sangue foi coletado em tubo seco com EDTA. Na primeira etapa do experimento foi realizada a extração de miRNA do plasma, usando o reagente comercial miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha) e seguindo o protocolo do fabricante. As amostras de miRNA obtidas foram quantificadas no aparelho Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de quantificação fluorométrica utilizando os reagentes da Qubit® microRNA assay kit (LifeTechnologies, Forest City, EUA). Essas amostras de miRNA foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C . Para a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) array, os miRNAs foram transcritos

primeiramente para DNA complementar (cDNA), devido à maior estabilidade dessa molécula, facilitando o manuseio durante o experimento. Foram utilizados os reagentes do RT² First Strand Kit (QIAGEN, 26 Métodos GmbH, Hilden, Alemanha) para transcrição reversa.

O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR array. Para o controle de qualidade das amostras de cDNA foi utilizada placa de miScript miRNA QC PCR array (código MIHS-989ZE-1, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que contém controle de quatro miRNAs (cel-miR-39-3p, cel-miR-16-5p, cel-miR-21-5p, cel-miR-191-5p), três non-coding RNA (SNORD 61, SNORD 95, SNORD 96A), miRTC (controle da transcrição reversa) e PPC (controle positivo da reação de PCR) para cada amostra. Somente as amostras com a pureza e qualidade satisfatórias foram selecionadas para o experimento de PCR array.

As expressões de miRNA do plasma (18 cessadores e 10 tabagistas) foram analisadas utilizando placa comercial denominada Human Inflammatory Response & Autoimmunity miScript miRNA PCR Array (código MIHS-105ZR-24, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que detecta perfil de miRNAs do painel inflamatório com registro do banco da miRBase ([www. miRNase.org](http://www.miRBase.org)). Para a análise da reação de PCR foi utilizado o sistema de real-time PCR Quanti Studio® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a análise dos resultados foi realizada por método de quantificação relativa, obtido pela expressão $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O fold change (calculado por $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) representa o valor da expressão de cada miRNA na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle. Valores maiores que um representam regulação positiva da expressão da sequência alvo (miRNA) nas amostras em estudo em relação às amostras controle e valores menores que um indicam regulação negativa da expressão. O fold regulation representa o resultado do fold change de uma forma biologicamente significativa (Livak, Schmittgen, 2001; Mestdagh et al., 2009; Hirata et al., 2013).

3.8 Análise Estatística

O tamanho da amostra ($n=20$) foi obtido por meio da média do teste da sacarina (valor normal 9 minutos) e desvio-padrão de 3 minutos (Nakagawa et

al., 2005, Oliveira-Maul et al., 2013), poder de 80% e alfa de 5%. Somamos mais 100% para possíveis perdas amostrais (desistências), totalizando 40 pacientes.

Para as análises estatísticas usamos o software Statistical Analysis System SAS versão 9.3 (SAS Institute, North Carolina, USA) e para as análises de expressão dos miRNA usamos o software Gene Globe Data Analysis – Web Resource (Qiagen, Hilden, Germany). Os dados estão descritos como média e desvio-padrão. As variáveis qualitativas estão descritas como número absoluto e porcentagem.

Para características demográficas, dados clínicos, comparação dos dados de COex e TTS entre os grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ou Qui-quadrado, quando apropriado. Para análise da expressão de miRNAs no plasma, usamos o Teste T pareado e para comparação entre os grupos usamos o Teste T não pareado. Para análise de correlações entre as variáveis utilizamos o Coeficiente de Correlação de Pearson. A diferença foi considerada estatisticamente significativa se $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

De agosto de 2015 a outubro de 2017, foram elegíveis 61 indivíduos no Programa de Cessação ao Tabagismo do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Porém foram incluídos apenas 44 indivíduos que concordaram em participar do estudo (Figura 5). Ao longo do estudo, 16 indivíduos desistiram do Programa. Dos 28 indivíduos que concluíram o estudo, 18 (73,7%) obtiveram sucesso na cessação (100% de redução da carga tabágica) e 10 indivíduos (26,3%) falharam na cessação, porém reduziram a carga tabágica (média de redução de $58,8\% \pm 21,2\%$, com variação entre 20-90%), sendo possível separá-los em dois grupos: Cessadores e Tabagistas.

Figura 5. Fluxograma do estudo

A análise das características demográficas (idade, sexo, IMC), clínicas (pressão arterial, FC, f, SpO₂) e de co-morbidades mostrou que os grupos Tabagistas e Cessadores são homogêneos em T0 (Tabela 1). No basal, os indivíduos de ambos grupos mostraram também semelhanças em relação a carga tabágica (tempo e quantidade de cigarros/ dia).

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão ($\pm$ DP) ou número absoluto e proporção das características demográficas e clínicas de Tabagistas e Cessadores em T0.

	Tabagistas n = 10	Cessadores n = 18	Valor-p
Idade, anos	52 $\pm$ 7	57 $\pm$ 7	0,123
Sexo masculino	3 (30)	11 (61)	0,237
IMC, kg/m²	30,2 $\pm$ 8,2	27,0 $\pm$ 4,6	0,270
Anos maço	41,2 $\pm$ 20,0	43,7 $\pm$ 18,0	0,532
Cigarros/dia	23 $\pm$ 10	22 $\pm$ 7	0,816
Tempo de exposição	36,0 $\pm$ 9,0	38,9 $\pm$ 10,0	0,428
COex, ppm	13 $\pm$ 6	10 $\pm$ 9	0,063
PAS, mmHg	130 $\pm$ 28	138 $\pm$ 28	0,259
PAD, mmHg	78 $\pm$ 16	86 $\pm$ 23	0,179
FC, bpm	78 $\pm$ 12	70 $\pm$ 12	0,072
f, rpm	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	0,347
SpO₂, %	94 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2	0,418
Co-morbidades, n (%)			
Hipertensão	9 (90)	16 (89)	0,927
Diabetes	4 (40)	4 (22)	0,318
Dislipidemia	5 (50)	11 (61)	0,569
DPOC	2 (20)	4 (22)	0,890
Enfisema	1 (10)	0 (0)	0,171
Depressão	0 (0)	2 (11)	0,274

Abreviaturas: COex, monóxido de carbono exalado; f, Frequência respiratória; FC, frequência cardíaca; IMC, índice de massa corpórea; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; SpO₂, saturação periférica de oxigênio; DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica.

Os indivíduos de ambos os grupos não relataram rinite, sinusite ou bronquite como antecedentes pessoais.

O grupo Tabagistas apresentou diferença significativa somente na relação VEF_1/CVF em T6 quando comparado com Cessadores no mesmo tempo (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) de espirometria entre os grupos, em avaliação T0 e T6.

	Tabagistas n=10		Cessadores n=18	
	T0	T6	T0	T6
CVF, L	3,32 $\pm$ 1,10	3,20 $\pm$ 1,00	3,41 $\pm$ 0,87	3,37 $\pm$ 0,86
CVF pred, %	90 $\pm$ 18	87 $\pm$ 18	89 $\pm$ 12	86 $\pm$ 14
VEF₁, L	2,38 $\pm$ 0,78	2,52 $\pm$ 0,90	2,45 $\pm$ 0,67	2,38 $\pm$ 0,64
VEF₁ pred %	80 $\pm$ 18	85 $\pm$ 21	81 $\pm$ 14	78 $\pm$ 15
VEF₁/CVF	0,71 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,06 ^a	0,72 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,07

Abreviaturas: CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo; pred, valores preditos; a, $p < 0,001$ vs Cessadores no mesmo tempo

Em relação aos sintomas sinonasais avaliados com o questionário SNOT-20, os grupos não apresentaram diferença significativa ao longo do estudo (Tabela 3).

Os grupos não apresentaram diferença significativa nos valores de SpO₂ ao longo do estudo (Tabela 4).

Nessa mesma tabela (Tabela 4), podemos observar que o TTS se mostrou prolongado (> 12 min, conforme Oliveira-Maul et al., 2013) em T0 em todos os indivíduos do estudo. Após o período de seis meses, os Cessadores normalizaram o TTS enquanto que os Tabagistas se mantiveram alterados.

Tabela 3 - Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) do questionário SNOT-20 entre os grupos, em avaliação T0 e T6.

	Tabagistas		Cessadores	
	n=10		n=18	
	T0	T6	T0	T6
Soma total, n	27 $\pm$ 10	27 $\pm$ 14	15 $\pm$ 13	15 $\pm$ 12
Soma questões 1-10, n	4 $\pm$ 5	5 $\pm$ 6	6 $\pm$ 7	4 $\pm$ 4

Tabela 4 - Análise comparativa dos valores (média $\pm$ DP) de cigarros/dia, SpO2, COex e TTS entre os grupos, em avaliação T0 e T6.

	Tabagistas		Cessadores	
	n=10		n=18	
	T0	T6	T0	T6
Cigarros/dia, n	23 $\pm$ 10	10 $\pm$ 10 ^a	22 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0 ^{b,c}
SpO2, %	94 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2	95 $\pm$ 2	96 $\pm$ 1
COex, ppm	13 $\pm$ 6	8 $\pm$ 3 ^d	10 $\pm$ 9	3 $\pm$ 2 ^{b,c}
TTS, min	23,0 $\pm$ 19,0	16,0 $\pm$ 16,1	16,0 $\pm$ 12,0	8,5 $\pm$ 8,0 ^{d,e}

Abreviaturas: SpO2, saturação periférica de oxigênio; COex, monóxido de carbono exalado; TTS, teste de trânsito da sacarina; a, p=0,002 vs T0 ; b, p<0,001 vs T0; c, p<0,001 vs Tabagistas mesmo tempo; d, p=0,020 vs T0; e, p=0,040 vs Tabagistas mesmo tempo

Observamos associação significativa entre as variáveis cigarros/dia e COex (r=0,61 e p <0,001), entre cigarros/dia e TTS (r=0,48 e p<0,001) e entre COex e TTS (r=0,32 e p=0,016) (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre as variáveis cigarro/dia e COex, cigarro/dia e TTS e COex e TTS.

	R	valor de p
Cigarros/dia vs COex	0,61	< 0,001
Cigarros/dia vs TTS	0,48	< 0,001
COex vs TTS	0,32	0,016

Abreviaturas: COex, monóxido de carbono exalado; TTS, teste de trânsito da sacarina

Quando comparado grupo Tabagistas com grupo Cessadores em T0, sete miRNAs estavam regulados negativamente (Tabela 6, Figura 6).

Tabela 6 - Expressão de miRNAs significativamente alterados no plasma de Tabagistas e Cessadores em T0, considerando os Tabagistas como controle.

microRNA	Tabagistas vs Cessadores		
	Fold change	Fold regulation	valor - p
hsa-miR-17-5p	0,34	-2,90	0,029
hsa-miR-20a-5p	0,26	-3,80	0,021
hsa-miR-20b-5p	0,21	-4,71	0,027
hsa-miR-30a-5p	0,25	-3,95	0,024
hsa-miR-93-5p	0,27	-3,63	0,022
hsa-miR-125a-5p	0,59	-1,70	0,038
hsa-miR-195-5p	0,19	-5,37	0,002

Em destaque miRNAs alterados em T0 e T6 em comum.

Quando comparado grupo Tabagistas com grupo Cessadores ao final do estudo (T6), seis miRNAs estavam regulados negativamente após a cessação (Tabela 7; Figura 6).

Tabela 7 - Expressão dos miRNAs significativamente alterados no plasma de Tabagistas e Cessadores em T6, considerando Tabagistas como controle.

microRNA	Tabagistas vs Cessadores		
	Fold change	Fold regulation	valor - p
hsa-miR-17-5p	0,19	-5,30	0,012
hsa-miR-20a-5p	0,49	-2,04	0,017
hsa-miR-20b-5p	0,18	-5,44	0,017
hsa-miR-93-5p	0,25	-4,00	0,041
hsa-miR-101-3p	0,21	-4,82	0,047
hsa-miR-125b-5p	0,27	-3,65	0,025

Em destaque miRNAs alterados em T0 e T6 em comum.

Quanto à análise da expressão dos miRNAs em plasma, comparamos isoladamente os grupos em T0 e T6 e observamos que os Tabagistas não apresentaram alterações nos miRNAs do painel selecionado (Inflamação e Auto-imunidade). Por outro lado, os Cessadores apresentaram redução significativa da expressão do miR-301b ao longo de seis meses (Tabela 8; Figura 6).

Tabela 8 - Expressão do miRNA hsa-miR-301b-3p no plasma de Tabagistas e de Cessadores comparando expressão em T6 e T0 em cada grupo.

hsa-miR-301b-3p	T6 vs T0		
	Fold change	Fold regulation	valor - p
Tabagistas	1,12	1,12	0,165
Cessadores	0,43	-2,29	0,038*

Figura 6. Níveis de expressão dos miRNAs diferentemente expressos no plasma de Tabagistas (Tab) e de Cessadores (Cess) em T0 (●), T6 (○) e entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram acompanhados durante seis meses indivíduos tabagistas que frequentaram um grupo de cessação e fornece novas informações sobre as alterações no perfil de miRNAs plasmáticos nestes indivíduos. Em avaliação basal (T0), o perfil de expressão dos miRNAs já se apresentava heterogêneo entre os indivíduos com carga tabágica considerada moderada a alta (≥ 15 cigarros por dia, de acordo com Reichert, 2008), mesmo com similaridades nas características demográficas e clínicas. Após seis meses, a redução de aproximadamente 50% no número de cigarros fumados por dia foi insuficiente para alterar o perfil de miRNAs nos Tabagistas, e apenas a redução completa da carga tabágica diária diminuiu de maneira significativa o miR-301b.

O tabagismo promove a inalação de mais de 9.000 substâncias químicas que possuem propriedades citotóxicas, mutagênicas, pró-inflamatórias e auto-imuno-reguladoras, induzindo condições hipóxicas, distúrbios inflamatórios e outras doenças (Cho et al., 2018). Entre essas substâncias, temos o monóxido de carbono (CO) que possui papel fundamental na hipóxia tecidual em tabagistas, pela produção de carboxihemoglobina (Underner; Pfeffer, 2010). Em nosso estudo, o COex foi utilizado para confirmar a carga tabágica, assim como em outros estudos (Utiyama et al., 2016; Bauld et al., 2009; Brose et al., 2013).

Em T0, ambos os grupos apresentavam valores de COex alterados configurando seu estado de tabagista ativo (Reichert, 2008; Bailey, 2013, Kotz, 2012). Apesar de existirem outras causas de exposição que alterem seus níveis (poluição ambiental, tabagismo passivo e exposição ocupacional), as alterações provocadas pela exposição direta ao tabaco são mais evidentes e provocam aumentos mais significantes do que as demais condições, podendo ser utilizada com boa segurança para monitoramento do tabagismo (Deveci et al., 2004; Perkins, Karelitz, Jao, 2013).

Após seis meses, os níveis de COex apresentaram diferença estatística significativa quando comparado grupo Cessadores (3 ± 2 ppm) com grupo

Tabagistas (8 ± 3 ppm; $p < 0,001$), demonstrando queda em relação aos valores basais e sugerindo abstinência no grupo Cessadores. O grupo Tabagistas apresentou redução da exposição (10 ± 10 cigarros por dia) sendo considerados tabagistas leves (Fiore et al., 2008), a redução do COex neste grupo provavelmente ocorreu pela queda do número de cigarros fumados por dia. Nossos dados corroboram com estudo de Utiyama et al. (2016) que observaram queda dos níveis de COex em cessadores do tabagismo no primeiro mês de cessação e se manteve até a avaliação de 12 meses.

As vias aéreas podem sofrer agressão por poluentes atmosféricos e agentes tóxicos do cigarro levando a aumento de sintomas respiratórios, inflamação pulmonar e infecções. Isto ocorre devido à liberação de espécies reativas de oxigênio nas vias aéreas quando em contato com partículas finas e ultrafinas dos poluentes e tóxicos (Lima et al., 2013; MacNee et al., 2011). Um dos principais mecanismos de defesa tanto da via aérea superior quanto inferior é o TMC, sendo responsável em controlar a exposição a agentes patogênicos e toxinas. Estudos mostram que em tabagistas regulares, o TMC é prolongado, sugerindo que a exposição da mucosa nasal aos produtos tóxicos do cigarro altera a frequência do batimento ciliar e o grau de comprometimento pode estar relacionado ao tipo de cigarro consumido e se o fumo é exalado pelo nariz ou pela boca (Anderson et al., 2015; Proença et al., 2011). Além do COex, acompanhamos a cessação do tabagismo pelo TMC, avaliado pelo TTS. Ambas as variáveis (COex e TMC) foram correlacionadas positivamente com o número de cigarros fumados por dia.

No início de nosso estudo, todos os indivíduos apresentavam comprometimento do TMC, demonstrado pelo TSS prolongado e melhorias significantes foram observadas após a cessação do tabagismo, dados que corroboram com estudo de Utiyama et al. (2016) e de Proença et al. (2011). Após seis meses, ambos os grupos apresentaram um TMC menos prolongado, com diferença significativa entre os grupos ($p = 0,040$). Porém apenas o grupo Cessadores apresentou melhoras mais evidentes, retornando ao nível de normalidade para o teste ($\sim 8,5$ min, $p = 0,020$), podendo este resultado estar associado à restauração do epitélio respiratório.

A hipóxia exibe um papel fundamental no desenvolvimento e

progressão de alguns tipos de câncer, como por exemplo, próstata, colorretal, pâncreas, cavidade oral e carcinomas pulmonares (Shen et al., 2013). Em nosso estudo, não realizamos nenhuma medida de hipóxia tecidual, porém conseguimos mostrar que a expressão plasmática do miR-301b foi semelhante no início do estudo entre os grupos, quando ainda possuíam uma carga tabágica alta, e o miR-301b foi significativamente reduzido nos Cessadores após seis meses. Em estudo de Wu et al. (2016) a expressão do miR-301b foi avaliada em linhagens de células de câncer de pulmão, células normais adjacentes e linhagens de células normais e demonstraram que o miR-301b encontra-se aumentado nas células de câncer de pulmão em comparação tanto com células normais adjacentes quanto em linhagens de células normais. Adicionalmente comprovaram que o miR-301b tem aumento da expressão em condições celulares de hipóxia, aumenta a proliferação celular, reduz a apoptose e aumenta a resistência ao tratamento com quimioterápicos. Em análise bioinformática, verificaram que o miR-301b tem como alvo a proteína Bim, que possui ação pró-apoptótica e também está envolvida no crescimento celular. O estudo também mostrou uma correlação negativa entre o alvo Bim e o miR-301b, comprovando que o aumento da expressão do miRNA, inibe a expressão do alvo Bim, comprometendo funções celulares importantes para o desenvolvimento de câncer.

Além disso, a superexpressão do miR-301b tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tem sido associada a aumento da autofagia, da proliferação celular, diminuição da apoptose, desenvolvimento e progressão de câncer e aumento da resistência à radioterapia (Wang et al., 2016), quimioterapia e à metástase (Shi et al., 2016; Li et al., 2019).

Nosso estudo possui algumas limitações. Os miRNAs são expressos em vários locais com uma ampla rede de ação e nós utilizamos o plasma como substrato para a identificação do perfil dos miRNAs. A maioria dos estudos sobre miRNAs utiliza tecidos de diferentes órgãos e/ou cultura de células em busca do perfil de expressão destes e com isto descobrir “assinaturas de miRNAs”, tornando possível identificar um tecido de acordo com a predominância específica dos miRNAs contidos nele (Momi et al., 2014). A expressão dos miRNAs nos tecidos humanos, indica uma grande e complexa

rede de atuação em diversos tipos celulares do organismo. Adicionalmente foram descobertos miRNAs circulantes, que costumam ser muito estáveis e transitam no sangue de humanos ligados à proteína Argonata2, possibilitando que os tecidos atuem como doadores e/ou alvos dos miRNAs. Deste modo, os miRNAs circulantes podem se assemelhar à expressão de miRNAs nos tecidos (Fuziwara et al., 2015; Weber et al., 2010).

Também não incluímos um grupo saudável (não fumante) e um estudo de validação com tecido pulmonar. Porém nosso objetivo foi acompanhar um programa de Cessação de Tabagismo e a biópsia pulmonar somente seria indicada em casos suspeitos ou positivos de câncer. No entanto, conseguimos mostrar um perfil diferente de miRNAs plasmáticos entre quem parou de fumar e quem falhou, após o período de seis meses. Outro aspecto a ser considerado, é o tamanho da amostra reduzido, porém estudos longitudinais clínicos são limitados. Um interessante estudo (Takahashi et al., 2013), utilizando um painel com 662 miRNAs mostrou que 11 fumantes apresentaram superexpressão de 44 miRNAs plasmáticos quando comparados com sete não fumantes. Após um mês de cessação do tabagismo, quatro indivíduos apresentaram regulação negativa de 60 miRNAs, dentre eles alguns que também foram regulados negativamente de modo significativo em nosso estudo: miR-17, miR-20a, miR-20b e miR-93.

Os miRNAs 17, 20a e 20b pertencem a uma mesma família, miR 17-92 (incluindo miR-17, 18a, 19a, 20a, 20b, 19b-1, 92a-1), sendo chamados de cluster. Isto significa que estes miRNAs são distribuídos de forma sequencial em regiões genômicas próximas, com distância máxima de 10.000 nucleotídeos e podem compartilhar um único promotor (pri-miRNA) e serem transcritos como uma unidade transcricional única, tendo como alvo os mesmos RNAm (Pinhal et al., 2015). Este cluster miR 17-92, já foi descrito como clássico oncogene (Esquela-Kerscher; Slack, 2006), a superexpressão desses miRNAs favorecem a formação de câncer possivelmente por inibir vias apoptóticas em resposta à superexpressão do oncogene MYC (*myelocytomatosis*) que induz as células a se proliferarem de forma incontrolável, resultando em câncer. Estes miRNAs já foram descritos em diversos tipos de câncer, porém sua potencial função oncogênica tem sido

descrita em casos de câncer de pulmão (principalmente de não pequenas células - CPNPC) e carcinoma nasofaríngeo (tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço), onde estes miRNAs encontram-se superexpressos (Jiang et al., 2014; Duan et al., 2019).

A superexpressão do miR-93-5p está relacionada a vias que promovem proliferação e migração de células cancerígenas, além de ser descrito como mediador de resistência a drogas quimioterápicas em câncer de pulmão (Huang et al., 2019).

Em estudo de Chen et al. (2019), foram analisados tecidos de câncer de pulmão de não pequenas células divididos em dois tipos: 513 amostras de adenocarcinoma e 478 de carcinoma espinocelular, comparados com tecidos normais correspondentes a cada tipo de câncer de pulmão. O grupo avaliou o perfil de expressão de miRNAs nos tecidos estudados e identificou os miRNAs diferentemente expressos. O miR-93-5p foi diferentemente expresso nos tecidos de carcinoma espinocelular, estando superexpresso em comparação com os controles de tecido normal. Além disso, o miR-93-5p quando correlacionado com dados clínicos foi significativamente associado à idade que o sujeito foi diagnosticado ($p=0,001$), metástase ($p=0,031$) e histórico de tabagismo ($p=0,018$).

Além destes miRNAs, no início de nosso estudo, os Cessadores tiveram regulação negativa do miR-125a e após 6 meses este mesmo grupo apresentou regulação negativa do miR-125b. Estes miRNAs pertencem à família miR-125 composta pelos miRs 125a, 125b e 125-2 que são validados na literatura com propriedades supressoras em algumas doenças, porém também exibem função promotora em outras condições. No geral seus genes-alvo estão relacionados com fator de transcrição, matriz metaloproteinase entre outros, cujo desbalanço pode ocasionar proliferação celular anormal, metástase e invasão celular, características importantes para o desenvolvimento de câncer. O miR-125b já foi descrito como oncogene em diversos tipos de câncer, com sua superexpressão relacionada a mielodisplasia, leucemia mielóide aguda, rinossinusite crônica eosinofílica com pólipos nasais, aumento da tumorigênese em carcinoma endometrial tipo II, indução de metástase em células de câncer de mama humano e supressão de

apoptose em glioblastoma multiforme humano. Um dos mecanismos propostos é que a família 125 tenha como alvo membros da família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) com função antiapoptótica, estando o miR superexpresso estimula a regulação positiva destes genes que protegem as células da apoptose, promovendo a tumorigênese. Devido a uma complexa rede de regulação formada pelos miRNAs, a diversidade e divergência de funções podem ocorrer dependendo do ambiente ao qual a célula está exposta, o tipo de tecido e estágio da doença (Sun et al., 2013).

Em nosso estudo, a regulação negativa dos miRNAs 17, 20a, 20b, 93 e 125a/b no plasma entre os dois grupos permaneceram após o período de seis meses. Nenhum dos indivíduos foi diagnosticado com câncer e apenas 20% deles foram diagnosticados com DPOC em cada grupo. Levantamos a hipótese de que a regulação negativa destes miRNAs em ambos os momentos de avaliação nos Cessadores, apesar das semelhanças de características clínicas, demográficas e de histórico de tabagismo com os Tabagistas, possam estar relacionadas a uma carga tabágica reduzida não relatada no início do estudo. De todo modo, as alterações dos miRNAs podem representar possíveis benefícios na prevenção ou detecção de doenças pulmonares e câncer.

O tabagismo crônico induz inflamação local nos pulmões e destruição do tecido elástico pulmonar, causando declínio na função pulmonar e limitação persistente ao fluxo aéreo (Çolak et al., 2019). Em nosso estudo não observamos alterações clínicas significantes em relação à função pulmonar, possivelmente devido às características clínicas e demográficas individuais que podem afetar os resultados após a cessação do tabagismo, sendo um indivíduo mais suscetível que o outro a obter melhora, hipótese já relatada por Josephs et al. (2017). Além disso, alguns estudos sobre cessação do tabagismo não mostraram relação linear entre a redução do número de cigarros por dia e melhora do VEF₁ no primeiro ano de abstinência (Simmons et al., 2005), porém os valores de VEF₁ parecem retornar à normalidade após dois anos de cessação (Willemse et al., 2004). Outro aspecto que poderia contribuir com os nossos resultados sobre função pulmonar, seria o uso de medicamentos e o período de acompanhamento. No entanto, nosso estudo, não mostrou diferenças significantes em relação a medicação utilizada entre os dois grupos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que a cessação do tabagismo promoveu melhora do TMC nasal, considerado importante mecanismo de defesa pulmonar, com a normalização do TTS.

Conseguimos mostrar que a exposição à fumaça do cigarro promove alterações dos miRNAs plasmáticos. Porém, a redução do número de cigarros fumados por dia (média de 58,5%) foi insuficiente para alterar o perfil plasmático dos miRNAs no período de seis meses no grupo Tabagistas. Apenas a cessação com redução de 100% da carga tabágica demonstrou regulação negativa significativa do miR-301b relacionado às condições hipóxicas, proliferação celular, diminuição da apoptose e aumento da resistência à radioterapia e quimioterapia, processos estes relacionados ao desenvolvimento e progressão de câncer.

7. ANEXOS

ANEXO A – Informações Básicas do Projeto Plataforma Brasil

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:
EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO GÊNICA DE MICRORNAS EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS

Informações Preliminares

Responsável Principal	
CPF/Documento: 091.431.798-94	Nome: Naomi Kondo Nakagawa
Telefone: 1130618529	E-mail: naomi.kondo@fm.usp.br

Instituição Proponente	
CNPJ: 63.025.530/0018-52	Nome da Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
879.692.038-68	Mario Hiroyuki Hirata
074.661.268-04	Iracema loco Kikuchi Umeda
375.832.748-26	Camila dos Santos Arcas
317.865.178-09	Daniela Mitiyo Odagiri Utiyama

Área de Estudo

Área Temática Especial

Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;)

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Clínico

Título Público da Pesquisa: Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e expressão gênica de microRNAs em sangue periférico de humanos

Contato Público			
CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
091.431.798-94	Naomi Kondo Nakagawa	1130618529	naomi.kondo@fm.usp.br

Contato Científico: Naomi Kondo Nakagawa

Data de Submissão do Projeto: 06/12/2019

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_815153_E3.pdf

Versão do Projeto: 6

Página 1 de 7

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e expressão gênica de microRNAs em sangue periférico de humanos

Pesquisador: Naomi Kondo Nakagawa

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 3

CAAE: 33427014.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 956.503

Data da Relatoria: 10/02/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto envolve o estudo das alterações moleculares e genéticas da exposição crônica aos produtos do cigarro nas vias respiratórias.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos envolvem avaliar os efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre (1) os mecanismos de defesa das vias aéreas e (2) avaliar alterações de microRNAs em sangue periférico de humanos. Serão incluídos 36 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos e recrutados no Programa de Cessação do Tabagismo da Divisão de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os voluntários serão acompanhados durante 6 meses e submetidos à avaliação no momento Basal e no 6º mês de acompanhamento. As avaliações consistirão de: anamnese clínica, exame físico e aplicação de questionários: (1) de sintomas rinossinusais (SNOT-20), de qualidade do sono (Pittsburg) e de qualidade de vida (Saint George) assim como serão avaliados (2) o transporte mucociliar nasal por meio do teste de sacarina, (3) as propriedades físicas do muco por meio de ângulo de contato e transportabilidade por tosse, (4) pH, celularidade total e diferencial em lavado nasal, (5)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 956.503

quantificação e identificação de proteínas do LN (6) o pH em condensado do ar exalado, (7) função pulmonar por espirometria (8) análise em sangue periférico de citocinas por enzimaímmunoensaio e da expressão de microRNAs por PCR-microarray.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não são mencionados na emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto já aprovado por este CEP em Agosto de 2014.

Solicita inclusão da análise sanguínea de perfil lipídico, glicemia e insulina de jejum, hemograma completo, proteína C-reativa e catecolaminas plasmáticas.

A emenda não é exclusiva de Centro Coordenador, portanto quando a emenda for aprovada, esta será replicada nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A justificativa dos autores para a inclusão das análises baseia-se na intenção de correlacionar as medidas, sendo que as coletas são procedimentos de rotina, e a quantidade de sangue coletado será mantida.

O TCLE não foi modificado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando o projeto já aprovado e que as coletas adicionais são rotinas, a emenda pode ser aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	
Bairro: PACAEMBU	CEP: 01.246-903
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br

Página 02 de 03

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 956.503

SAO PAULO, 19 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Página 03 de 03

ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Coparticipante

INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa das vias aéreas e expressão gênica de microRNAs em sangue periférico de humanos

Pesquisador: Naomi Kondo Nakagawa

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 1

CAAE: 33427014.0.3001.5462

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 916.364

Data da Relatoria: 15/12/2014

Apresentação do Projeto:

Desenho do estudo é longitudinal. Os voluntários do Programa de Cessação do Tabagismo da HCFUMSP serão avaliados no basal (Basal), 6º mês (C6) e 12º mês (C12).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos do tabagismo e da cessação do tabagismo sobre os mecanismos de defesa, inflamação das vias aéreas e expressão de microRNAs no sangue periférico ao longo de 12 meses por meio de: (a) o TMC nasal por meio do teste da sacarina; (b) as propriedades físicas do muco nasal por meio do ângulo de contato e transportabilidade por alto fluxo; (c) o pH do EBC; (d) o pH, a celularidade total, contagem diferencial do LN por morfometria, (e) a função pulmonar por meio de espirometria; (f) quantificação e identificação de proteínas do LN; (g) análise da expressão de microRNA por PCR-microarray e quantificação da expressão de interleucina IL-1, TGF-, TNF-, (IL)-4, IL-6, IL-8, IL-10, MPO e de cotinina em sangue periférico por meio de enzima imunensaio (ELISA); e (h) qualidade de vida, de sintomas rinosinusais e de qualidade do sono em tabagistas e em indivíduos de um programa de cessação do tabagismo.

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

Bairro: Ibirapuera

CEP: 04.012-909

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040

Fax: (11)5085-6040

E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Continuação do Parecer: 916.364

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos do estudo são mínimos porque essas avaliações já foram utilizadas em crianças, jovens, idosos e inclusive em pacientes gravemente enfermos. De qualquer forma, o(a) sr(a) contará com a ajuda para quaisquer esclarecimentos por parte da equipe de saúde que acompanhará todo o estudo.

Não há benefício direto para os indivíduos que participarão do estudo, mas os resultados desse estudo poderão contribuir no entendimento dos efeitos do hábito de fumar e da cessação do tabagismo sobre o sistema respiratório do corpo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou e aprovou o Projeto de Pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto de Pesquisa Clínica/ Coparticipação – Aprovado
- Questionário de saúde geral e acompanhamento clínico – Entregue
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Parecer Consubstanciado da Unidade Proponente – Entregue
- Convênio Acadêmico-Científico – Entregue
- Autorização Unidade Coparticipante/ Profª Dra. Amanda GMR Sousa – Entregue
- Folha de Rosto da Proponente – Entregue

Recomendações:

- a) Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido.
- b) Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar			
Bairro: Ibirapuera		CEP: 04.012-909	
UF: SP	Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)5085-6040	Fax: (11)5085-6040	E-mail: cep@dantepazzanese.org.br	

Página 02 de 03

INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Continuação do Parecer: 916.364

c) Elaborar e apresentar ao CEP relatório semestral sobre o andamento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em reunião ordinária realizada no dia 16 de dezembro de 2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em reunião ordinária realizada no dia 16 de dezembro de 2014.

SAO PAULO, 16 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Pedro Silvio Farsky
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

Página 03 de 03

ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
 BAIRRO: ..... CIDADE .....
 CEP: .....
 TELEFONE: DDD (.....) .....
 2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
 ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: ....
 BAIRRO: ..... CIDADE: ..... CEP: ...
 TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO DE MICRORNAs EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS**
2. PESQUISADORES: FT. Camila dos Santos Arcas e DRA. Naomi Kondo Nakagawa.
 CARGO/FUNÇÃO: FISIOTERAPEUTA E PROFESSORA DE FISIOTERAPIA (respectivamente)
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CREFITO 174087-F e CREFITO 5076-F
 UNIDADE DO HCFMUSP: LABORATÓRIO DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EXPERIMENTAL FMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : maio de 2018 a junho 2019.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – O presente projeto avaliará: (a) o transporte mucociliar por meio do teste de sacarina, (b) as propriedades físicas do muco nasal por meio de ângulo de contato e transportabilidade por tosse, (c) pH, celularidade total e diferencial, citocinas e proteômica em lavado nasal e (d) o pH em condensado do ar exalado (e) função pulmonar por espirometria e (f) análise de microRNAs em sangue periférico em pacientes tabagistas e ex-tabagistas.

2 – Se o(a) Sr(a). concordar em participar do estudo, faremos uma avaliação com aplicação de questionários sobre seus dados pessoais, que demora em torno de 15 minutos, e um questionário de sintomas nasais, seguidos de exame físico para medida de pressão arterial, oxigenação periférica, temperatura corporal, frequência respiratória e frequência cardíaca. Em seguida, verificaremos qual a narina desobstruída para o teste da sacarina. Colocaremos 5 grãos de sacarina no nariz e marcaremos com cronômetro o tempo que Sr(a). referir sentir o gosto do adoçante na garganta. Em seguida, coletaremos o muco nasal com ajuda de um pincel. Depois faremos o teste do lavado nasal onde colocaremos 5 ml de soro fisiológico por meio de uma seringa no seu nariz e o(a) Sr(a). ficará 10 segundos sem respirar e devolver em um pote o soro fisiológico do seu nariz. Para a coleta do condensado do ar exalado o Sr(a). respirará pela boca durante um período de 10 a 15 minutos, conectado a um aparelho por um bocal descartável. Também coletaremos 6 ml de sangue periférico. Esses exames serão realizados em 3 avaliações: no começo do estudo, 6 meses de acompanhamento e 12 meses de acompanhamento.

3 – Não há qualquer obrigatoriedade da sua participação neste estudo. Da mesma forma, a qualquer momento o(a) Sr(a). poderá deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo ao Sr(a). Os riscos do estudo são mínimos porque essas avaliações já foram utilizadas em crianças, jovens, idosos e inclusive em pacientes gravemente enfermos. De qualquer forma, o(a) sr(a) contará com a ajuda para quaisquer esclarecimentos por parte da equipe de saúde que acompanhará todo o estudo.

4 – Os grãos de sacarina colocados no nariz podem causar leve sensação de doce no final do teste ou vontade de espirrar no início. A coleta do muco do nariz pode fazer o Sr(a). sentir uma leve coceira no nariz. No teste do lavado nasal, o(a) Sr(a). poderá sentir pequeno desconforto de ficar sem respirar por 10 segundos. Para a coleta do condensado do ar exalado precisará segurar o equipamento de peso menor que 0,5 Kg com uma mão durante o período de 10-15 minutos. Na coleta de sangue periférico que será realizada por pessoal especializado, poderá ficar um pequeno hematoma ou dor na região da coleta.

5- Não há benefício direto para o(a) Sr(a). Mas os resultados desse estudo poderão contribuir no entendimento dos efeitos do hábito de fumar e da cessação do tabagismo sobre o sistema respiratório do corpo.

6 – O(a) Sr(a). tem garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são a Dra. Camila dos Santos Arcas e a Dra Naomi Kondo Nakagawa, que podem ser encontradas no Laboratório de Defesa Pulmonar. Av. Dr. Arnaldo, 455 - 1º andar, sala 1150; Telefone: 11 30618529 (Dra. Naomi) e 11 993365435 (Dra. Camila) E-mail:camila.arcas@usp.br. Se o(a) Sr(a). tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br e Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde - (CEP/SMS)- Rua General Jardim, 36 1º andar Tel: 3397-2464 / Fax: 33972465 ou E-mail: smscep@gmail.com.

7. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

8. Direito de confidencialidade – As informações do(a) sr(a) serão analisadas em conjunto com outros pacientes, e não será divulgada a sua identidade;

9. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Caso haja dano associado ou decorrente da pesquisa – agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa o(a) sr(a) poderá solicitar indenização - cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa.

12. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **EFEITOS DO TABAGISMO E DA CESSAÇÃO DO TABAGISMO SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DAS VIAS AÉREAS E EXPRESSÃO DE MICRORNAs EM SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS**. Eu discuti com a Dra. Camila dos Santos Arcas sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. **Também autorizo além da coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do muco nasal, do lavado do nariz e do sangue referentes a esse projeto de pesquisa específico.**

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO E - SNOT 20

AVALIAÇÃO DE RESULTADOS NASOSSINUSAIS. (SNOT-20)

Você encontrará abaixo uma lista de sintomas e consequências sociais e emocionais da sua rinossinusite. Gostaríamos de saber mais sobre estes problemas e pedimos que respondesse às seguintes perguntas da melhor maneira possível. Não há respostas certas ou erradas e somente você pode nos dar essas informações. Por gentileza, dê uma nota para seus problemas conforme se apresentaram nas duas últimas semanas. Obrigado por sua participação. Caso tenha alguma dúvida, peça a nossa ajuda imediatamente.

	Nehum problema	Problema muito pequeno	Problema pequeno	Problema moderado	Problema sério	Pior problema possível	5 itens mais importantes
1. Considerando a gravidade do problema, quando aparece e a frequência com que acontece; dê uma nota para cada item abaixo de acordo com o grau de intensidade do problema. Faça um círculo ao redor do número que corresponde ao que você sente. Use a escala ao lado:							
1. Necessidade de assoar o nariz	0	1	2	3	4	5	☐
2. Espirros	0	1	2	3	4	5	☐
3. Nariz escorrendo	0	1	2	3	4	5	☐
4. Tosse	0	1	2	3	4	5	☐
5. Secreção nasal escorrendo para a garganta	0	1	2	3	4	5	☐
6. Secreção nasal grossa	0	1	2	3	4	5	☐
7. Ouvido tampado	0	1	2	3	4	5	☐
8. Tontura	0	1	2	3	4	5	☐
9. Dor de Ouvido	0	1	2	3	4	5	☐
10. Dor/ pressão na face	0	1	2	3	4	5	☐
11. Dificuldade de pegar no sono	0	1	2	3	4	5	☐
12. Acordar durante a noite	0	1	2	3	4	5	☐
13. Falta de uma boa noite de sono	0	1	2	3	4	5	☐
14. Acordar cansado	0	1	2	3	4	5	☐
15. Fadiga	0	1	2	3	4	5	☐
16. Produtividade diminuída	0	1	2	3	4	5	☐
17. Concentração reduzida	0	1	2	3	4	5	☐
18. Frustrado / Inquieto/ Irritado	0	1	2	3	4	5	☐
19. Triste	0	1	2	3	4	5	☐
20. Envergonhado com a doença	0	1	2	3	4	5	☐
2. Favor marcar os itens mais importantes que estão prejudicando sua saúde (máximo de 5 itens)							→ ↑

Bezerra, TFP; Piccirillo, JF; Fornazieri, MA; Pílan, RR de M; Abdo, TRT; Pinna, F de R; Padua, FG de M; Voegels, RV. (2011)

ANEXO F – FICHA CLÍNICA

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____ identificação: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____ Altura: _____ Peso: _____ Estado civil: _____

Endereço: _____

Bairro: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Estado: _____

Telefone: _____ Celular: _____ Grau de

escolaridade: _____

Profissão: _____ Moradia: _____ Animais: _____

HAS ( ) não ( ) sim medicamento: _____

DM ( ) não ( ) sim medicamento: _____

DPOC ( ) não ( ) sim medicamento: _____

outros ( ) não ( ) sim medicamento: _____

Internações hospitalares prévias: _____

Infecção respiratória: ( ) não ( ) sim

quando: _____

Fagerstrom: _____ Quantos cigarros/dia: _____ Há quanto tempo: _____

Realiza atividade física: ( ) não ( ) sim quantas vezes na

semana: _____

Parâmetros	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4
Data e hora				
Narina ( )				
STT - crômetro				
FC				
PA				
T				
Sat O2				
Freq. Resp				
COex				
COHb				
Temp amb				
Umidade ar				
pH LN				
pH EBC				
Tosse				
Angulo				
Cel totais				
Neutrófilos				
Linfócitos				
Eosinófilos				
Macrófagos				
Ciliadas				
Caliciformes				

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson WH, Coakley RD, Button B, Henderson AG, Zeman KL, Alexis NE, Peden DB, Lazarowski ER, Davis CW, Bailey S, Fuller F, Almond M, Qaqish B, Bordonali E, Rubinstein M, Bennett WD, Kesimer M, Boucher RC. The relationship of mucus concentration (hydration) to mucus osmotic pressure and transport in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 192(2):182-190.
- Anthoninsen N, Skeins A, Wise R, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE, Lung Health Study Research Group. *Ann Intern Med*. 2005;142:233-239.
- Arantes ILG, Vaslin MFS, Corrêa CAP, Pereira TC, Corrêa RL. Regulação da abundância de miRNAs: Transcrição, processamento, exportação, modificações pós-transcricionais, edição e degradação. In: Pereira, TC. *Introdução ao mundo dos microRNAs*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. Cap.3, p.66-81.
- Bauld L, Bell K, McCullough L, Richardson L, Greaves L. The effectiveness of NHS smoking cessation services: a systematic review. *J Public Health*. 2009;32(1):71-82.
- Bailey BA. Using expired air carbon monoxide to determine smoking status during pregnancy: Preliminary identification of an appropriately sensitive and specific cut-point. *Addict Behav*. 2013;38(10):2547-2550.
- Becoña E, Míguez MC. Concordance of self-reported abstinence and measurement of expired air carbon monoxide in a self-help smoking cessation treatment. *Psychol Rep*. 2006;99(1):125-130.
- Bezerra TFP, Piccirillo JF, Fornazieri MA, Pihan RRM, Abdo TGT, Pinna FR, Padua FGM, Voegels RL. Cross-cultural adaptation and validation of SNOT-20 in portuguese. *Int J of Otolaryngol*. 2011;1-5. doi: 10.1155/2011/306529.
- Bough K, Lerman C, Rose J, McClernon F, Kenny P, Tyndale R, David S, Stein E, Uhl G, Conti D, Green C, Amur S. Biomarkers for smoking cessation. *Clin Pharmacol e Ther*. 2013;93(6):527-538.
- Brose LS, Tombor I, Shahab L, West R. The effect of reducing the threshold for carbon monoxide validation of smoking abstinence – Evidence from the English Stop Smoking Services. *Addict Behav*. 2013;30(10):2529-2531.
- Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette Smoking-Attributable Morbidity - United States, 2000. *Morbidity Mortality Weekly Report*. 2003;52(35):842-844.
- Centers for Disease Control and Prevention. Smoking-Attributable Mortality, Years of Potential Life Lost, and Productivity Losses - United States, 2000-2004. *Morbidity Mortality Weekly Report*. 2008;57(45):1226-1228.
- Chen B, Gao T, Yuan W, Zhao W, Wang T, Wu J. Prognostic value of survival of microRNAs signatures in non-small cell lung cancer. *J Cancer*.

2019;10(23):5793-5804.

Cho YJ, Thrasher JF, Swayampakala K, Lipkus I, Hammond D, Cummings KM, Borland R, Yong H, Hardin JW. Does adding information on toxic constituents to cigarette pack warnings increase smokers' perceptions about the health risks of smoking? A longitudinal study in Australia, Canada, Mexico and the United States. *Health Educ Behav*. 2018;45(1):32-42.

Cohen NA, Zhang S, Sharp DB, Tamashiro E, Chen B, Sorscher EJ, Woodworth BA. Cigarette smoke condensate inhibits transepithelial chloride transport and ciliary beat frequency. *Laryngoscope*. 2009;119(11):2269-74.

Çolak Y, Afzal S, Lange P, Nordestgaard BG. Smoking, systemic inflammation, and airflow limitation: a mendelian randomization analysis of 98058 individuals from the general population. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(8):1036-1044.

Culver B, Graham B, Coates A, Wanger J, Berry C, Clarke P, Hallstrand T, Hankinson J, Kaminsky D, MacIntyre N, McCormack M, Rosenfeld M, Stanojevic S, Weiner D. Recommendations for a Standardized pulmonary function report. American Thoracic Society. *Am J Respir Care*. 2017;196(11):1463-1472.

Deveci SE, Deveci F, Açik Y, Ozan AT. The measurement of exhaled carbon monoxide in healthy smokers and non-smokers. *Respir Med*. 2004;98(6):551-556.

Doll R, Peto R, Boreham J. Mortality in relation to smoking: 50 years observations on male British doctors. *BMJ*. 2004;328:1519-1533.

Duan B, Shi S, Yue H, You B, Ying S, Zhu Z, Bao L, You Y. Exosomal miR-17-5p promotes angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via targeting BAMBI. *J Cancer*. 2019;10(26):6681-6692.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-269.

Fiore MC, Jaen CR, Baker TB, et al. Treating Tobacco Use and Dependence: 2008 Update. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. May 2008.

Fuziwara CSF, Del Debbio CB, Kimura ET. MiRNAs na fisiologia humana. In: Pereira, TC. Introdução ao mundo dos microRNAs. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. Cap.9, p.166-173.

Gaworski CL, Dozier MM, Eldridge SR, Morrissey R, Rajendran N, Gerhart JM. Cigarette smoke vapor-phase effects in the rat upper respiratory tract. *Inhalation Toxicology*. 1998;10:857-73. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Pocket Guide to COPD diagnosis, management, and prevention: A guide for health care professionals. 2017.

Hamm JT, Yee S, Rajendran N, Morrissey RL, Richter SJ, Misra M. Histological alterations in male A/J mice following nose-only exposure to tobacco smoke. *Inhalation Toxicology*. 2007;19:405-18.

- Harvey BG, Heguy A, Leopold PL, Carolan BJ, Ferris B, Crystal RG. Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *J Mol Med*. 2007;85:39-53.
- Hill SL, Webber B. Mucus transport and physiotherapy – a new series. *Eur Respir J*. 1999;13(5):949-50.
- Hirata MH, Hirata RDC, Hirata TDC, Wang HT, Silva JL, Germano JF. In: Sousa, AGMR, Hirata MH. *Ciências da Saúde no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia: volume biologia molecular*. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. Cap.6, p.143-155.
- Huang W, Yang Y, Wu J, Niu Y, Yao Y, Zhang J, Huang X, Liang S, Chen R, Guo L. Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- β signalling. *Cell Death Differ*. 2019, doi:10.1038/s41418-019-0455-x.
- Huang J, Wu J, Li Y, Li X, Yang T, Yang Q, Jiang Y. Deregulation of serum microRNA expression is associated with cigarette smoking and lung cancer. *BioMed Research International*. 2014:1-13. dx.doi.org/10.1155/2014/364316.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Organização Pan-Americana de Saúde. Pesquisa especial de tabagismo – PETab: relatório Brasil. Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2011.
- Izzotti A, Larghero P, Longobardi M, Cartiglia C, Camoirano A, Steele V, De Flora S. Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. *Mutat Res*. 2011;717:9-16.
- Jiang Z, Yin J, Fu W, Mo Y, Pan Y, Dai L, Huang H, Li S, Zhao J. miRNA 17 family regulates cisplatin-resistant and metastasis by targeting TGF β R2 in NSCLC. *Plos One*. 2014;9(4):1-9.
- Josephs L, Culliford D, Johnson M, Thomas M. Improved outcomes in ex-smokers with COPD: a UK primary care observational cohort study. *Eur Respir J*. 2017;49(5). doi: 10.1183/13993003.02114-2016.
- Konrad F, Schiener R, Marx T, Georgieff M. Ultrastructure and mucociliary transport of bronchial respiratory epithelium in intubated patients. *Intensive Care Med*. 1995;21(6):482-489.
- Kotz D. Possible reasons for elevated carbon monoxide levels in self-reported ex-smokers. *Nicotine Tob Res*. 2012;14(8):900-901.
- Lalem T, Devaux Y. Circulating microRNAs to predict heart failure after acute myocardial infarction in women. *Clin Biochem*. 2019;70:1-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.05.011
- Li P, Xing W, Xu J, Yuan D, Liang G, Liu B, Ma H. microRNA-301b-3p downregulation underlies a novel inhibitory role of long non-coding RNA MBNL1-AS1 in non-small cell lung cancer. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):144. doi: 10.1186/s13287-019-1235-8.
- Lima TM, Kazama CM, Koczulla AR, Hiemstra OS, Macchione M, Fernandes ALG, Santos UP, Bueno-Garcia ML, Zanetta DM, Andre CDS, Saldiva PHN,

- Nakagawa NK. pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllers and office-workers. *Clinics*. 2013;68(12):1488-1494.
- Livak, KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero S, Ebert BJ, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz R, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834-838. doi:10.1038/nature03702
- Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchao FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PHN. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect*. 1999;107(10):829-833.
- MacNee W, Rennard SI, Hunt JF, Edwards LD, Miller BE, Locantore NW, Tal-Singer R. Evaluation of exhaled breath condensate pH as a biomarker for COPD. *Respir Med*. 2011;105:1037-1045.
- Meyer KC. Lung infections and aging. *Ageing Res Rev*. 2004;3:55-67.
- Mestdagh P, Vlierberghe PV, Weer AD, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6). doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-338.
- Momi N, Kaur S, Rachgani S, Ganti AK, Batra SK. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. *Trends Mol Med*. 2015;20(1). doi. 10.1016/j.molmed.2013.10.005.
- Mullen JBM, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Structure of central airways in current smokers and ex-smokers with and without mucus hypersecretion: relationship to lung function. *Thorax*. 1987;42:843-848.
- Nakagawa NK, Macchione M, Petrolino HM, Guimaraes ET, King M, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Effects of a heat and moisture exchanger and a heated humidifier on respiratory mucus in patients undergoing mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2000;28:312-317.
- Nakagawa NK, Franchini ML, Driusso P, oliveira LR, Saldiva PH, Lorenzi G. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. *Chest*. 2005;128(5):2772-2777.
- Nicola ML, Carvalho HB, Yoshida CT, Anjos FM, Nakao M, Santos U de P, Farsky SH, Rubin BK, Nakagawa NK. Young “healthy” smokers have functional and inflammatory changes in the nasal and lower airways. *Chest*. 2014;145(5):998-05.
- Oliveira-Maul JP, de Carvalho HB, Goto DM, Maia RM, Fló C, Barnabé V,

- Franco DR, Benabou S, Perracini MR, Jacob-Filho W, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G, Rubin BK, Nakagawa NK. Aging, diabetes, and hypertension are associated with decreased nasal mucociliary clearance. *Chest*. 2013;143(4):1091-1097.
- Pereira CAC, Neder JA. Diretrizes para testes de função pulmonar. *J Pneumol*. 2002;28:S1-S41.
- Pereira CAC, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007;33(4):397-406.
- Pereira CAC. Testes de Função Pulmonar. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia – Projeto Diretrizes, 2001. Disponível em: <https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/testes-de-funcao-pulmonar.pdf>.
- Perkins KA, Karelitz JL, Jao NC. Optimal carbon monoxide criteria to confirm 24-hr smoking abstinence. *Nicotine Tob Res*. 2013;15(5):978-982.
- Piccirillo JF, Merritt-Jr MG, Richards ML. Psychometric and clinimetric validity of the 20-item SinoNasal Outcome Test (SNOT20). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;126(1):41-47.
- Pinhal D, Nachtigall PG, Oliveira AC, Bovolenta LA, Herkenhoff ME. Origem e evolução de microRNAs. In: Pereira, TC. *Introdução ao mundo dos microRNAs*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. Cap.2, p.33-57.
- Pinto MT, Pichon-Riviere A, Bardach A. Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos. *Cad. Saúde Pública*. 2015;31(6):1283-1297.
- Pottelberge GRV, Mestdagh P, Bracke KR, Thas O, Van Durme YMTA, Joos GF, Vandesompele J, Brusselle GG. MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Care Med*. 2010;183:898-906.
- Proença M, Xavier RF, Ramos D, Cavalheri V, Pitta F, Cipulo Ramos EM. Efeito imediato e a curto prazo do cigarro sobre o transporte mucociliar nasal de fumadores. *Rev Port Pneumol*. 2011;17(4):172-176.
- Reichert J, Araujo AJ, Gonçalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MPU, Santos SRRA. Diretrizes para cessação do tabagismo -2008. *J Bras Pneumol*. 2008;34(10):845-880.
- Ricarte-Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(6):1102-1107.
- Rizk SA, Metwally FM, Elfiky AM, Mahmoud AA, Badawi NA, Sharaf NE, Elhefnawi MM. Down-regulation of circulating microRNA let-7a in Egyptian smokers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2018;16:53-56.
- Shembri F, Sridhar S, Perdomo C, Gustafon A, Zhang X, Ergun A, Lu J, Liu G, Zhang X, Bowers J, Vaziri C, Ott K, Sensiger K, Collins J, Brody JS, Getts R, Lenburg ME, Spira A. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *PNAS*. 2009;106(7):2319-2324.

- Shen G, Li X, Jia Y-F, Piazza GA, Xi Y. Hypoxia-regulated microRNAs in human câncer. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:336-341.
- Shi YK, Zang QL, Li GX, Huang Y, Wang SZ. Increased expression of microRNA-301a in nonsmall-cell lung cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):693-698.
- Simmons MS, Connett JE, Nides MA, Lindgren PG, Kleerup EC, Murray RP, Bjornson WM, Tashkin DP. Smoking reduction and the rate of decline in FEV1: results from the Lung Healthy Study. *Eur Respir J.* 2005;25:1011-1017.
- Smith PH, Bessette AJ, Weinberger AH, Sheffer CE, McKee AS. Sex/gender differences in smoking cessation: a review. *Prev Med.* 2016;92:135-140.
- Stanley PJ, Wilson R, Greenstone MA, Macwilliam L, Col PJ. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax.* 1986;41:519-523.
- Sun Y, Lin K, Chen Y. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol e Oncol.* 2013;15(6). doi: 10.1186/1756-8722-6-6.
- Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(1):154-160.
- Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema – an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(1):503-511.
- Underner M, Pfeffer G. Interpretation of exhaled CO levels in studies on smoking. *Rev Mal Respir.* 2010;27(4):293-300.
- Utiyama DMO, Yoshida CT, Goto DM, Carvalho TS, Santos UP, Koczulla AR, Saldiva PHN, Nakagawa NK. The effects of smoking and smoking cessation on nasal mucociliary clearance, mucus properties and inflammation. *Clinics.* 2016;71(1):344-350.
- Wang G, Wang R, Strulovici-Barel Y, Salit J, Staudt MR, Ahmed J, Tilley AE, Yee-Levin J, Hollmann C, Harvey BG, Kaner RJ, Mezey JG, Sridhar S, Pillai SG, Hilton H, Wolff G, Bitter H, Visvanathan S, Fine JS, Stevenson CS, Crystal RG. Persistence of smoking-induced dysregulation of miRNA expression in the small airway epithelium despite smoking cessation. *Plos One.* 2015;10(4). doi:10.1371/journal.pone.0120824
- Wang W, Liu M, Gtuan Y, Wu Q. Hypoxia-responsive miR301a and miR301b promote radioresistance of prostate câncer cells via downregulating NDRG2. *Med Sci Monit.* 2016;22:2126-2132.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-1741.
- World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2019- Offer help to quit tobacco use. Geneva: World Health Organization. 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Willemse BWM, Postma DS, Timens W, ten Hacken NHT. The impact of

smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*. 2004;23:464-476.

Willinger CM, Rong J, Tanriverdi K, Courchesne PL, Huan T, Wasserman GA, Lin H, Dupuis J, Joehanes R, Jones MR, Chen G, Benjamin EJ, O'Connor GT, Mizgerd JP, Freedman JE, Larson MG, Levy D. MicroRNA signature of cigarette smoking and evidence for a putative causal role of microRNAs in smoking-related inflammation and target organ damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10(5). doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001678.

Wu D, Chen B, Cui F, He X, Wang W, Wang M. Hypoxia-induced microRNA-301b regulates apoptosis by targeting Bim in lung cancer. *Cell Prc* 2016;49:476-483.